

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年2月22日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/12814 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/31, 15/52,
15/63, 1/19, 1/21, C12P 7/40, C12Q 1/68

Yuki) [JP/JP]. 細渕 雅彦 (HOSOBUCHI, Masahiko)
[JP/JP]. 吉川博治 (YOSHIKAWA, Hiroji) [JP/JP]; 〒
971-8183 福島県いわき市泉町下川字大畑389-4 三共
株式会社内 Fukushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05420

(74) 代理人: 大野彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo
(JP).

(22) 国際出願日: 2000年8月11日 (11.08.2000)

(81) 指定国(国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN,
KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(30) 優先権データ:
特願平11/227696 1999年8月11日 (11.08.1999) JP

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 三共株
式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒
103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 阿部有生 (ABE,

(54) Title: ML-236B BIOSYNTHESIS-ASSOCIATED DNA

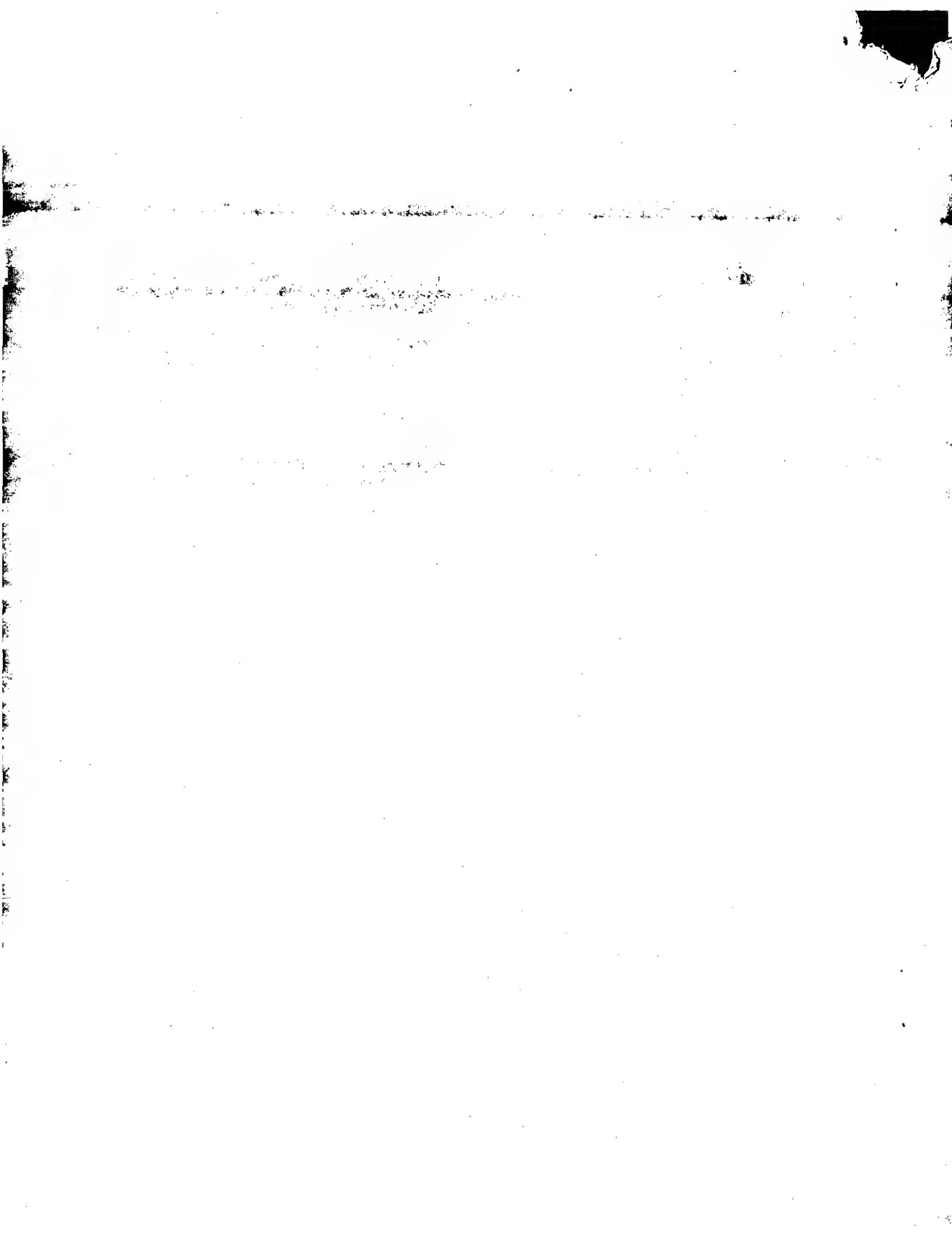
(54) 発明の名称: ML-236B生合成関連DNA

(57) Abstract: A DNA which has been cloned from a genomic DNA library of an ML-236B producing microorganism and is characterized by being capable of improving the ML-236B productivity of this strain when transferred thereto, etc. When transferred into the ML-236B producing strain, the above DNA improves the ML-236B productivity of this strain.

(57) 要約:

本発明は、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーよりクローニングされた、該菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA等を提供する。

本発明の提供するDNAは、ML-236B生産菌内に導入されることにより、該菌のML-236B生産能を改善する。



(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日 Published
2001年2月22日 (22.02.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/12814 A1

- (51) 国際特許分類¹: C12N 15/31, 15/52,
15/63, 1/19, 1/21, C12P 7/40, C12Q 1/68
Yuki) [JP/JP]. 細瀬雅彦 (HOSOBUCHI, Masahiko)
[JP/JP]. 吉川博治 (YOSHIKAWA, Hiroji) [JP/JP]; 〒
971-8183 福島県いわき市泉町下川字大畠389-4 三共
株式会社内 Fukushima (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05420
filed
- (22) 国際出願日: 2000年8月11日 (11.08.2000) (74) 代理人: 大野彰夫, 外 (OHNO, Akio et al.); 〒140-8710
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo
(JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国(国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN,
KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.
- (30) 優先権データ:
特願平11/227696 1999年8月11日 (11.08.1999) JP (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 三共株
式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒
103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo
(JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 阿部有生 (ABE,
- 添付公開書類:
— 國際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ML-236B BIOSYNTHESIS-ASSOCIATED DNA

(54) 発明の名称: ML-236B 生合成関連DNA

(57) Abstract: A DNA which has been cloned from a genomic DNA library of an ML-236B producing microorganism and is characterized by being capable of improving the ML-236B productivity of this strain when transferred thereto, etc. When transferred into the ML-236B producing strain, the above DNA improves the ML-236B productivity of this strain.

(57) 要約:

本発明は、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーよりクローニングされた、該菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA等を提供する。

本発明の提供するDNAは、ML-236B生産菌内に導入されることにより、該菌のML-236B生産能を改善する。

WO 01/12814 A1

41

sep

ID AAF74546 standard; DNA; 34203 BP.
XX
AC AAF74546;
XX
DT 14-MAY-2001 (first entry)
XX
DE Penicillium citrinum ML-236B biosynthesis-associated DNA SEQ ID NO:1.
XX
KW Penicillium citrinum; ML-236B biosynthesis; antilipaemic; hyperlipaemia;
KW HMG-CoA reductase inhibitor; ds.
XX
OS Penicillium citrinum.
XX
PN WO200112814-A1. *also in the EP document*
XX
PD 22-FEB-2001.
XX
PF 11-AUG-2000; 2000WO-JP05420.
XX
PR 11-AUG-1999; 99JP-0227696.
XX
PA (SANY) SANKYO CO LTD.
XX
PI Abe Y, Hosobuchi M, Yoshikawa H; *appd.*
XX
DR WPI; 2001-202868/20.
XX
PT New DNA for transfer into a microbial strain to enhance productivity of
PT the HMG-CoA reductase inhibitor designated ML-236B, for treating
PT hyperlipemia -
XX
PS Claim 1; Page 69-89; 128pp; Japanese.
XX
CC The present invention describes a DNA sequence (I) containing a sequence
CC (S1) of 34203 base pairs (bp) (the present sequence) which can be
CC transferred into an ML-236B producing strain to improve productivity,
CC obtained from transformant Escherichia coli pML48 SANK71199 strain
CC (FERM BP-6780). The modified microorganism is capable of improving its
CC ML-236B productivity for use as HMG-CoA reductase inhibitor in treating
CC hyperlipaemia, and can also be used in clarifying the directions and
CC locations of the 6 structural genes in the DNA. (I) has antilipaemic
CC activity, and can be used as an HMG-CoA reductase inhibitor.
XX
SQ Sequence 34203 BP; 8506 A; 8634 C; 8543 G; 8520 T; 0 other;

Query Match 88.6%; Score 1222; DB 22; Length 34203;
Best Local Similarity 90.9%; Pred. No. 0;
Matches 1380; Conservative 0; Mismatches 0; Indels 138; Gaps 2;

Qy 1 ATGTCCCTGCCGCATGCAACGATTCCGACGAACCTACGCCGTGCGCGTTTCGACGCTCA 60
Db 33804 ATGTCCCTGCCGCATGCAACGATTCCGACGAACCTACGCCGTGCGCGTTTCGACGCTCA 33745

Qy 61 TGTGACCGGTGTATGCACAAAAGCTAAATGTACCGTAGCAATGCCATTAGTCCGT 120
Db 33744 TGTGACCGGTGTATGCACAAAAGCTAAATGTACCGTAGCAATGCCATTAGTCCGT 33685

IT
-Sep
NO: 1
in my
applicatio
@100%.

Qy 121 GCTCAGTGTCAACGTTGTCAACAAGCCGGATTAAGGTGTGTACAGCGAAAGGCTACCC 180
Db 33684 GCTCAGTGTCAACGTTGTCAACAAGCCGGATTAAGGTGTGTACAGCGAAAGGCTACCC 33625

Qy 181 AAGCGCAATTACATAAAGAACGCCAGCTGGAACACTACAAGAGCCACAGAAACCTCACAA 240
Db 33624 AAGCGCAATTACATAAAGAACGCCAGCTGGAACACTACAAGAGCCACAGAAACCTCACAA 33565

Qy 241 CCGATGACCGCGACATCTTCTACGGTCTCTCATCATTGGCAGAGACTCCTCCACCTTAC 300
Db 33564 CCGATGACCGCGACATCTTCTACGGTCTCTCATCATTGGCAGAGACTCCTCCACCTTAC 33505

Qy 301 TGCTCACCAACCTACGCATATTGGCACCTCGGCACTCAAGGAAACATTATCAGAACCATCA 360
Db 33504 TGCTCACCAACCTACGCATATTGGCACCTCGGCACTCAAGGAAACATTATCAGAACCATCA 33445

Qy 361 GCGGCAACCCTGCAATTCTATGATACATCAATCAACTTGTATGATCCCAGTCGTTCCC 420
Db 33444 GCGGCAACCCTGCAATTCTATGATACATCAATCAACTTGTATGATCCCAGTCGTTCCC 33385

Qy 421 GGCGGCTGGCCTCAGCAAATACATTTCGGACATGCCAACAGCAATGAATCTCGGGG 480
Db 33384 GGCGGCTGGCCTCAGCAAATACATTTCGGACATGCCAACAGCAATGAATCTCGGGG 33325

Qy 481 ATACCAGATCTAGGCTACGACTTGAAGGCCCTTGGATGCAACGGCGCTGTCTCGCCA 540
Db 33324 ATACCAGATCTAGGCTACGACTTGAAGGCCCTTGGATGCAACGGCGCTGTCTCGCCA 33265

Qy 541 TCGCTTTGACCTCGAAGTAGAGGGAACTCGTCATCCGGACAATCCAACACAAGCAAC 600
Db 33264 TCGCTTTGACCTCGAAGTAGAGGGAACTCGTCATCCGGACAATCCAACACAAGCAAC 33205

Qy 601 ACGCAACGAGACCTTTCGAAAGTCTGCGATGTGTCACAGGACCTAGAGGTAACTC 660
Db 33204 ACGCAACGAGACCTTTCGAAAGTCTGCGATGTGTCACAGGACCTAGAGGTAACTC 33145

Qy 661 CACGGGGTACTGTGGAATGCCAAGCAAAAAATTAAAGCT----- 703
Db 33144 CACGGGGTACTGTGGAATGCCAAGCAAAAAATTAAAGCTGTGAGATTCAATTCT 33085

Qy 704 -----ACCCGATAGGGGACTTT 720
Db 33084 GCCTGTTACTGCCTTGTGATTGTCGCTAAAGCTTCTCCTAGACCCGATAGGGGACTTT 33025

Qy 721 TTGAATGCCTTGGTAGATTGCTACTACATCTCAAGAACGTGTGATCACGAGCAGCAAT 780
Db 33024 TTGAATGCCTTGGTAGATTGCTACTACATCTCAAGAACGTGTGATCACGAGCAGCAAT 32965

Qy 781 AGCAGCATGTTAGATGGGTCTGCAAACCAAGAACCTGTTCATGGCGGTGCATTGCTAC 840
Db 32964 AGCAGCATGTTAGATGGGTCTGCAAACCAAGAACCTGTTCATGGCGGTGCATTGCTAC 32905

Qy 841 ATGTTGTCTGTCAAAATCATGACATCACTTCCCAGCTGCTACTATCCGAGGTGATGAAA 900
Db 32904 ATGTTGTCTGTCAAAATCATGACATCACTTCCCAGCTGCTACTATCCGAGGTGATGAAA 32845

Qy 901 GCCCAACCTTGTGGACAAAGCAAAGCACACGAATGGATTGGTACTGGTCTGGCTAACCC 960
|||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....
Db 32844 GCCCAACCTTGTGGACAAAGCAAAGCACACGAATGGATTGGTACTGGTCTGGCTAACCC 32785

Qy 961 ACTAGAAATGACAATGGAAGAGCCGAAGCAGTCCTCGTTCACTCTAATCTCATATC 1020
|||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....
Db 32784 ACTAGAAATGACAATGGAAGAGCCGAAGCAGTCCTCGTTCACTCTAATCTCATATC 32725

Qy 1021 GGCGAGCTCATTACATCTGACCCATTGACGCCTTATCTTCTGCATGCACGACA 1080
|||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....
Db 32724 GGCGAGCTCATTACATCTGACCCATTGACGCCTTATCTTCTGCATGCACGACA 32665

Qy 1081 TTGCGTGTAAGCCTTCGACTATTGAGTGAGATTGAGACTGCTTGGGATAGCACAGGAG 1140
|||.....|||||.....|||||.....|||||.....|||||.....
Db 32664 TTGCGTGTAAGCCTTCGACTATTGAGTGAGATTGAGACTGCTTGGGATAGCACAGGAG 32605

Qy 1141 CACGGGCTGCGGCATCTATCGTCTA----- 1167
|||.....|||||.....
Db 32604 CACGGGCTGCGGCATCTATCGTAGTAAGTGGGACCGATAACCACCAAGTCTTTCTT 32545

Qy 1168 -----GTCTATCAGATATG 1182
|||.....|||||.....
Db 32544 CCCTTGCATACATCAGCAATGCGCTGACCGGGAGAGGGGAATAGGTCTATCAGATATG 32485

Qy 1183 CCAAGCACATCGTGGCAAATCCTTGGCGCTGAAAATAAAACATAACGCCGGCCTCGT 1242
|||.....|||||.....
Db 32484 CCAAGCACATCGTGGCAAATCCTTGGCGCTGAAAATAAAACATAACGCCGGCCTCGT 32425

Qy 1243 CTCCATCTGTGCTTGGAGTGACGAAGCCGGAGACGAAGAGCCAAGTCAACAAAGGCC 1302
|||.....|||||.....
Db 32424 CTCCATCTGTGCTTGGAGTGACGAAGCCGGAGACGAAGAGCCAAGTCAACAAAGGCC 32365

Qy 1303 TCAGGGAAAGACGATAATGTGTTGCGACGTTGCTATAAGGAAATATTGCATTAGCGAAG 1362
|||.....|||||.....
Db 32364 TCAGGGAAAGACGATAATGTGTTGCGACGTTGCTATAAGGAAATATTGCATTAGCGAAG 32305

Qy 1363 AAACACAATATTGCTTAG 1380
|||.....|||||.....
Db 32304 AAACACAATATTGCTTAG 32287

明細書

ML-236B生合成関連DNA

「技術分野」

本発明は、HMG-CoA還元酵素阻害剤ML-236B生産菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、該DNAとハイブリダイズする核酸分子、該DNAを組み込んだ組換えDNAベクター、該組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、ML-236Bの製造法、該DNA上の塩基配列に基いて設計されたPCR用プライマー等に関する。

「背景技術」

高脂血症改善薬として臨床において使用されているHMG-CoA還元酵素阻害剤プラバスタチンは、ペニシリウム・シリナムが生産するML-236Bをストレプトミセス・カルボフィラス (*Streptomyces carbophilus*) により微生物変換することにより得られる (Endo, A., et al., J. Antibiot., 29, 1346 (1976) : Matsuoka, S., et al., Eur. J. Biochem., 184, 707 (1989) 記載)。

プラバスタチンの前駆体ML-236B、及び、プラバスタチンと部分構造を共有するHMG-CoA阻害剤ロバスタチンは、ともにポリケチドを経て生合成されることが示されている (Moore, R. N., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 3694 (1985) : Shiao, M. and Don, H. S., Proc. Natl. Sci. Counc. ROC., 11, 223 (1987) 記載)。

ポリケチドとは、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低分子カルボン酸残基の連続的な縮合反応から生じる β -ケト炭素鎖から導かれる化合物の総称であり、各 β -ケトカルボニル基の縮合・還元様式により、多様な構造が導かれる (Hopwood, D. A. and Sherman, D. H., Annu. Rev. Genet., 24, 37-66 (1990) : Hutchinson, C. R. and Fujii, I., Annu. Rev. Genet., 49, 201-238 (1995) 記載)。

ポリケチドの合成を担うポリケチド・シンターゼ (Polyketide Synthase: 以下、「PKS」という。) は糸状菌や細菌の有する酵素であることが知られており、糸状菌では該酵素の分子生物学的研究がなされている

(Feng, G. H. and Leonard, T. J., J. Bacteriol., 177, 6246 (1995) : Takano, Y., et al. Mol. Gen. Genet. 249, 162 (1995) 記載)。ロバスタチン生産菌であるアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) については、トリオールPKS遺伝子の解析がなされている (特表平9-504436号公報記載)。

ところで、糸状菌の二次代謝産物の生合成関連遺伝子は、ゲノム上でクラスターを形成していることが少なくない。ポリケチドの生合成系にて、該系に関与する遺伝子クラスターの存在が知られている。アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) の生産するポリケチドであるアフラトキシンの生合成では、PKSその他ポリケチドの生合成に関与する酵素蛋白質をコードする遺伝子がクラスター構造を形成していることが知られており、両菌のアフラトキシン生合成関連遺伝子のゲノム比較解析が行なわれている (Yu, J., et al., Appl. Environ. Microbiol., 61, 2365 (1995) 記載)。アスペルギルス・ニジュランス (*Aspergillus nidulans*) の生産するステリグマトシスチンの生合成においては、生合成関連遺伝子が、ゲノム上の連続する約60kbの領域においてクラスター構造を形成していることが報告されている (Brown, D. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載)。

ML-236B生合成に関する分子生物学的研究は、今まで十分にはなされていなかった。

「発明の開示」

発明者らは、ペニシリウム・シリナムのML-236B生合成を担う酵素の遺伝子又は遺伝子クラスターを、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーよりクローニングし、得られた組換えDNAベクターを用いて該生産菌を形質転換することにより、該生産菌においてML-236Bの生産性が改善されることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、

(1) 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203で示される塩基

配列を含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。

(2) 形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) より得ることができる、(1) 記載のDNA。

(3) (1) 又は (2) 記載のDNAとハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。

(4) (1) 又は (2) 記載のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。

(5) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載のDNAを含む組換えDNAベクター。

(6) 形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) に保持される、(5) 記載の組換えDNAベクター。

(7) (5) 又は (6) 記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

(8) ML-236B生産菌であることを特徴とする (7) 記載の宿主細胞。

(9) ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、(8) 記載の宿主細胞。

(10) (8) 又は (9) 記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法。

(11) 大腸菌であることを特徴とする、(7) 記載の宿主細胞。

(12) 形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199 (FERM BP-6780) である、(11) 記載の宿主細胞。

(13) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号23045のアデニン又はそれより5'ー側の塩基を5'ー末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーA1。

(14) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と70%以上の相同意を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA2

(但し、該PCR用プライマーA2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(15) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA3

(但し、該PCR用プライマーA3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(16) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA4

(但し、該PCR用プライマーA4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(17) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号1479のシトシン又はそれより5'ー側の塩基を5'ー末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーB1、

(18) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と70%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB2

(但し、該PCR用プライマーB2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(19) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と80%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB3

(但し、該PCR用プライマーB3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(20) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と90%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB4

(但し、該PCR用プライマーB4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(21) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号11748のアデニン又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーC1、

(22) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC2

(但し、該PCR用プライマーC2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(23) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC3

(但し、該PCR用プライマーC3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(24) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC4

(但し、該PCR用プライマーC4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(25) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号14362のチミン又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーD1、

(26) (25) 記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と70%以上の相同

性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー D 2
(但し、該 PCR 用プライマー D 2 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 19837 乃至 19839 によりコードされるセリン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(27) (25) 記載の PCR 用プライマー D 1 の塩基配列と 80 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー D 3

(但し、該 PCR 用プライマー D 3 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 19837 乃至 19839 によりコードされるセリン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(28) (25) 記載の PCR 用プライマー D 1 の塩基配列と 90 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー D 4

(但し、該 PCR 用プライマー D 4 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 19837 乃至 19839 によりコードされるセリン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(29) 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 11796 のアデニン又はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を有する PCR 用プライマー E 1、

(30) (29) 記載の PCR 用プライマー E 1 の塩基配列と 70 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー E 2

(但し、該 PCR 用プライマー E 2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 11796 乃至 11798 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(31) (29) 記載の PCR 用プライマー E 1 の塩基配列と 80 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー E 3

(但し、該 PCR 用プライマー E 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 11796 乃至 11798 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(32) (29) 記載の PCR 用プライマー E 1 の塩基配列と 90 % 以上の相同

性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー E 4

(但し、該 PCR 用プライマー E 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 11796 乃至 11798 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(33) 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 20723 のチミン又はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を有する PCR 用プライマー F 1、

(34) (33) 記載の PCR 用プライマー F 1 の塩基配列と 70 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー F 2

(但し、該 PCR 用プライマー F 2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 13476 乃至 13478 によりコードされるシステイン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(35) (33) 記載の PCR 用プライマー F 1 の塩基配列と 80 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー F 3

(但し、該 PCR 用プライマー F 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 13476 乃至 13478 によりコードされるシステイン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(36) (33) 記載の PCR 用プライマー F 1 の塩基配列と 90 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー F 4

(但し、該 PCR 用プライマー F 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 13476 乃至 13478 によりコードされるシステイン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(37) 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 24321 のアデニン又はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を有する PCR 用プライマー G 1、

(38) (37) 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 70 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 2

(但し、該 PCR 用プライマー G 2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番

号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(39) (37) 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 80% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 3

(但し、該 PCR 用プライマー G 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(40) (37) 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 4

(但し、該 PCR 用プライマー G 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(41) 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 6 3 1 2 のチミン又はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 1 、

(42) (41) 記載の PCR 用プライマー H 1 の塩基配列と 70% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 2

(但し、該 PCR 用プライマー H 2 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 7 8 8 7 乃至 2 7 8 8 9 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(43) (41) 記載の PCR 用プライマー H 1 の塩基配列と 80% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 3

(但し、該 PCR 用プライマー H 3 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 7 8 8 7 乃至 2 7 8 8 9 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(44) (41) 記載の PCR 用プライマー H 1 の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 4

(但し、該 PCR 用プライマー H 4 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番

号 27887 乃至 27889 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(45) 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 3545 のアデニン又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 1、

(46) (45) 記載の PCR 用プライマー I 1 の塩基配列と 70 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 2

(但し、該 PCR 用プライマー I 2 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3545 乃至 3547 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(47) (45) 記載の PCR 用プライマー I 1 の塩基配列と 80 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 3

(但し、該 PCR 用プライマー I 3 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3545 乃至 3547 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(48) (45) 記載の PCR 用プライマー I 1 の塩基配列と 90 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 4

(但し、該 PCR 用プライマー I 4 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3545 乃至 3547 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(49) 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 28472 のチミン又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 1、

(50) (49) 記載の PCR 用プライマー J 1 の塩基配列と 70 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 2

(但し、該 PCR 用プライマー J 2 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 5727 乃至 5729 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)、

(51) (49) 記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ3

(但し、該PCR用プライマーJ3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(52) (49) 記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ4

(但し、該PCR用プライマーJ4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(53) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号400のアデニン又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK1、

(54) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK2

(但し、該PCR用プライマーK2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(55) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK3

(但し、該PCR用プライマーK3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(56) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK4

(但し、該PCR用プライマーK4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(57) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号32287のシトシン又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL1、

(58) (57)記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL2

(但し、該PCR用プライマーL2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(59) (57)記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL3

(但し、該PCR用プライマーL3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、及び、

(60) (57)記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL4

(但し、該PCR用プライマーL4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、
に関する。

本発明は、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生産能を改善することを特徴とする、該生産菌のゲノムに由来するDNA(以下、「ML-236B生合成関連DNA」という。)等に関する。

本発明において、ML-236B生産菌とは、ML-236B生産能を先天的に有する微生物をいう。ML-236B生産菌としては、例えば、ペニシリウム(Penicillium)属に属するML-236B生産菌が挙げられ、ペニシリウム・シトリナム、ペニシリウム・ブレビコンパクタム(Penicillium brevicompactum: Brown, A. G., et al., J. Chem. Soc. Perkin-1., 1165(1976)記載)、ペニシリウム・シクロピウム(Penicillium cyclopium: Doss, S. L., et al., J. Natl. Prod.,

49,357(1986)記載)等が例示される。さらに、これら以外に、ユーペニシリウム・エスピ一 M6603 (*Eupenicillium* sp. M6603 : Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、ペシロミセス・ビリディス FERM P-6236 (*Paecilomyces viridis* FERM P-6236 : 特開昭58-98092号公報記載)、ペシロミセス・エスピ一 M2016 (*Paecilomyces* sp. M2016 : Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、トリコデルマ・ロンギプラチアタム M6735 (*Trichoderma longibrachiatum* M6735 : Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、ヒポミセス・クリソスペルムス IFO 7798 (*Hypomyces chrysospermus* IFO 7798 : Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、グリオクラディウム・エスピ一 YJ-9515 (*Gliocladium* sp. YJ-9515 : WO 9806867号公報記載)、トリコデルマ・ビリデ IFO 5836 (*Trichoderma viride* IFO 5836 : 特公昭62-1915号公報記載)、ユーペニシリウム・レチクリスピルム IFO 9022 (*Eupenicillium reticulisorum* IFO 9022 : 特公昭62-1915号公報記載)等が挙げられる。これらのML-236B生産菌のうち、好適にはペニシリウム・シトリナムであり、より好適にはペニシリウム・シトリナム SANK13380株である。ペニシリウム・シトリナム SANK13380株は、平成4年(1992年)12月22日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に国際寄託され、受託番号FERM BP-4129を付された。

ML-236B生合成関連DNAは、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーに対して、類似の機能を有するものと推測される糸状菌由来のDNAの塩基配列に基いて設計されるプローブを用いてスクリーニングを行なうことにより得られる。

ゲノムDNAライブラリーの作成法としては、通常真核生物のゲノムDNAライブラリーを作製するための方法であれば特に限定されないが、例えば、マニアティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記

載) 等が挙げられる。

ML-236B生産菌のゲノムDNAは、該生産菌培養物から菌体を回収して物理的に破碎した後、核内DNAを抽出、精製することにより得られる。

ML-236B生産菌の培養は、各ML-236B生産菌に適した条件下で行なうことができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シリナムの培養は、該菌体を培養したスラントから、MBG3-8培地(組成; 7%(w/v)グリセリン、3%(w/v)グルコース、1%(w/v)大豆粉、1%(w/v)ペプトン(極東製薬工業(株)製)、1%(w/v)コーンスチーブリカ(ホーネンコーポレーション(株)製)、0.5%(w/v)硝酸ナトリウム、0.1%(w/v)硫酸マグネシウム七水和物、pH6.5)へ該菌体を接種し、22乃至28℃、3乃至7日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。該スラントは、溶解させたPGA寒天培地(組成; 200g/L馬鈴薯抽出液、15%(w/v)グリセリン、2%(w/v)寒天)を試験管に注ぎ、傾斜させつつ固化させたものに、白金耳を用いてペニシリウム・シリナムを接種し、22乃至28℃、7乃至15日保温することにより作製する。該スラントを0乃至4℃で保存することにより、該スラント上で該菌を継続的に生存させることができる。

液体培地で培養したML-236B生産菌の菌体は、遠心分離により、固体培地で培養した該菌の菌体は、セル・スクレーパー等でかきとることにより、それ回収することができる。

菌体の物理的破碎は、菌体を液体窒素等で凍結しつつ乳鉢と乳棒で碎すことにより行なうことができる。破碎された菌体の核内DNAの抽出は、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulphate:以下、「SDS」という。)等の界面活性剤を用いて行なうことができる。抽出されたゲノムDNAは、フェノール・クロロホルム抽出を行なうことにより除タンパクされ、エタノール沈殿を行なうことにより沈殿として回収することができる。

得られたゲノムDNAを適当な制限酵素で限定分解させ、断片化する。限定分解に使用される制限酵素としては、通常入手可能な制限酵素であれば特に限定されないが、例えば、Sau3A等を挙げることができる。断片化されたDNA

をゲル電気泳動に供し、適当なサイズのゲノムDNAを含むゲルからDNAを回収する。DNA断片のサイズには特に限定はないが、好適には20 kb以上である。

ゲノムDNAライブラリー作製用のDNAベクターとしては、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞内で複製されるのに必要な塩基配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター、BACベクター等が挙げられ、好適にはコスミドベクターである。また、これらDNAベクターは発現ベクターであってもよい。さらに、該DNAベクターは、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞に表現形質（表現型；Phenotype）の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

該DNAベクターは、クローニング及び機能発現の双方に適用できるものであることが好ましい。該DNAベクターとしては、複数の微生物群に形質転換可能なシャトルベクターを用いることが好ましい。該シャトルベクターは、少なくとも一方の微生物群の宿主細胞において複製されるのに必要な塩基配列を有する。また、シャトルベクターは複数の微生物群の宿主にそれぞれ表現形質の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

該シャトルベクターにより形質転換される微生物群の組合せとしては、一方の微生物群がクローニングに適用でき且つ他方がML-236B生産能を有していれば特に限定されないが、例えば、細菌及び糸状菌の組合せ、酵母及び糸状菌の組合せ等が挙げられ、好適には細菌及び糸状菌の組合せである。細菌としては、通常遺伝子工学に使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌、枯草菌等を挙げることができ、好適には大腸菌であり、より好適には大腸菌XL1-Blue MR株である。酵母としては、通常遺伝子工学に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等を挙げることができる。糸状菌としては、上述のML-236B生産菌等が挙げられる。なお、本発明において微生物群は、細菌、糸状菌及び酵母から選択される。

このようなシャトルベクターとしては、例えば、適当な表現型選択マーカー遺伝子及びコス (c o s) 部位を有するコスマドベクター等を挙げることができ、好適には大腸菌ハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子配列を有するプラスミド p SAK 3 3 3 (特開平3-262486号公報記載) にコスマドベクター p WE 1 5 (STRATAGENE社製) の有するコス (c o s) 部位を挿入して作製された p SAK_{c o s} 1 が挙げられるが、これらに限定されない。p SAK_{c o s} 1 の構築手順については図1に記載されている。

上述のML-236B生産菌ゲノムDNA断片をライゲーションしたシャトルベクターを宿主細胞に導入することにより、所望のゲノムDNAライブラリーが完成する。宿主細胞には、好適には大腸菌、より好適には大腸菌XL1-BIueMR株がそれぞれ使用される。宿主細胞が大腸菌の場合、該導入は *in vitro* パッケージングにより行なう。本発明において、形質転換とは、*in vitro* パッケージングによる外来DNAの導入も意味し、*in vitro* パッケージングにより外来DNAを導入された細胞も形質転換細胞の意味に包含される。

所望のクローンのスクリーニングには、抗体又は核酸プローブを用い、好適には、核酸プローブを用いる。該核酸プローブは、糸状菌のポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて作製することができる。このような遺伝子としては、ポリケチドの生合成への関与が確認され且つ塩基配列が公知のものであれば特に限定されないが、例えば、アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*) 及びアスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) のアフラトキシンPKS遺伝子、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) のストリグマトシスチンPKS遺伝子等を挙げることができる。

該核酸プローブは、上述の公知の塩基配列に基づいて、ゲノムDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプローブの合成により、またオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、ゲノムDNAを錆型としたポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction: 以下、「PCR」という。: Saiki, R. K., et al., Science, 239, 487(1988) 記載) を行なうことにより、

又は、mRNAを鑄型として、逆転写酵素 (reverse transcriptase) でcDNAを合成した後、PCRを行なう方法 (逆転写PCR: reverse transcription-PCR: 以下、「RT-PCR」という。) 等により、取得することができる。

核酸プローブのML-236B生産菌からのPCR又はRT-PCRによる取得方法は、以下の通りである。PCR又はRT-PCRに使用するプライマー (以下、「PCR用プライマー」という。) の設計は、塩基配列が公知であるところのポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて、好適にはアスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*) 、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) のアフラトキシンPKS遺伝子又はアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) のストリグマトシスチンPKS遺伝子の塩基配列に基づいて設計することができる。これらのうちいずれか一つのPKSのアミノ酸配列上で種間保存性の高いアミノ酸配列を塩基配列に還元することにより、PCR用プライマーを設計することができる。アミノ酸配列から塩基配列に還元する方法としては、宿主のコドン使用頻度を考慮して单一の配列を導く方法又は多重コドンを使用して混合配列 (以下、「ミックス・プライマー」という。) を導く方法の二通りが使用できる。後者の場合、塩基配列にヒポキサンチンを含有させることにより多密度を下げることができる。

また、PCR用プライマーには、鑄型鎖とアニーリングするための塩基配列に加え、該プライマーの5' -末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

さらに、PCR用プライマーの設計においては、グアニン塩基の数とシトシン塩基の数の和が総塩基数の40乃至60%であることが好ましい。また、自己アニーリングし難いことが好ましい。一組のPCR用プライマーにおいては、双方のPCR用プライマー同士がアニーリングし難いことが好ましい。

また、PCR用プライマーの塩基数は、PCRに適用できれば特に限定されないが、その範囲の下限は10乃至14、上限は40乃至60であり、好適な範囲は14乃至40である。

さらに、PCR用プライマーは、好適にはDNAである。該プライマーを構成するヌクレオシドとしては、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシミジン、デオキシグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジン及びグアノシンに加え、デオキシイノシン、イノシン等が挙げられる。

また、PCR用プライマーの5'一末端に位置するヌクレオシドの5'一位は、水酸基であるか、又は、該水酸基に一リン酸がエステル結合した状態である。

さらに、PCR用プライマーの合成は、通常核酸の合成に使用される方法、例えば、ホスフォロアミダイト法により行なうことができ、このような方法には、DNA自動合成機が好適に使用される。

PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のゲノムDNAが、RT-PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のmRNAが、それぞれ使用できる。なお、RT-PCRの鋳型としては、mRNAの代わりに全RNAを使用することも可能である。

PCR産物又はRT-PCR産物をこのものに適したDNAベクターに組込むことにより、該PCR産物又はRT-PCR産物をクローニングすることができる。該クローニングに用いるDNAベクターとしては、通常DNA断片をクローニングするのに使用されるDNAベクターであれば特に限定されない。また、PCR産物又はRT-PCR産物のクローニングを簡便に行なうキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Original TA Cloning Kit (Invitrogen製：DNAベクターとしてpCR2.1を使用している。) が好適に使用される。

クローニングしたPCR産物の取得は、所望のPCR産物を含んでいることを確認した形質転換宿主細胞を培養し、該細胞からプラスミドを抽出、精製し、得られたプラスミドから挿入DNA断片を回収することにより行なうことができる。

形質転換宿主細胞の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができる。

好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB 培地（1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキストラクト、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム）で、30乃至37°C、18時間乃至2日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。

形質転換宿主細胞の培養物からのプラスミドの調製は、該宿主細胞の菌体を回収し、ゲノムDNAやタンパク質を除去することによりなされる。好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養物からのプラスミドの調製は、マニアティスらのアルカリ法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) により行なうことができる。また、より純度の高いプラスミドを得るためにキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Mini Kit (QIAGEN社製) が好適に使用される。さらに、プラスミドの大量調製を行うキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Maxi Kit (QIAGEN社製) が好適に使用される。

得られたプラスミドのDNA濃度は、DNA試料を適宜希釈して波長260nmにおける吸光度を測定し、吸光度 $1 = \text{DNA } 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ として算出することができる。DNAの純度は、波長280及び260nmの吸光度の比率から算出することができる。

核酸プローブの標識は、放射性標識及び非放射性標識に大別される。放射性標識に使用される放射性核種としては、通常使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、 ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C 等を挙げることができ、好適には ^{32}P である。非放射性標識に用いる試薬としては、通常核酸の標識に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、ジゴキシゲニン、ビオチン等が挙げられ、好適にはジゴキシゲニンである。核酸プローブを標識する方法としては、通常使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、標識基質を用いたPCRにより該産物中に取り込ませる方法、ニック・トランスレーション法、ランダム・プライマー法、末端標識法、標識基質を用いてオリゴDNAを合成する方法等を挙げることができ、核酸プローブの種類等によりこれらの方法から適宜選択でき

る。

核酸プローブの塩基配列がML-236B生産菌のゲノム中に存在することは、該生産菌のゲノムDNAを用いたサザンプロット・ハイブリダイゼーションにより確認することができる。

サザンプロット・ハイブリダイゼーションは、マニアティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) により行なうことができる。

上述の通り作製された標識核酸プローブを用い、ゲノムDNAライブラリーから目的クローンをスクリーニングすることができる。該スクリーニング法としては、通常遺伝子クローニングに使用される方法であれば特に限定されないが、好適にはコロニー・ハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) を使用することができる。

コロニー・ハイブリダイゼーションに用いるコロニーの培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができ、好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB寒天培地 (1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキストラクト、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム、1.5% (w/v) アガロース) 上で、30乃至37°C、18時間乃至2日間保温することにより行なうことができる。

コロニー・ハイブリダイゼーションにより得られる陽性クローンからの組換えDNAベクターの調製は、該陽性クローンの培養物からプラスミドを抽出及び精製することによりなされる。

本発明において得られた陽性クローンである形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199株は、平成11年(1999年)7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1-1-3)に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付された。E. coli pML48 SANK71199株が保持する組換えDNAベクターはpML48と命名された。

陽性クローンの保有する組換えDNAベクターが所望のML-236B生合成関連DNAを含んでいることは、該組換えDNAベクターの挿入塩基配列の決定、サザンプロット・ハイブリダイゼーション又は機能発現により確認できる。

DNAの塩基配列は、マキサム-ギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980) 記載) 又はジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269 (1982) 記載) 等により決定できる。なお、塩基配列決定に供するプラスミドDNAとしては、より純度の高い標品が好ましい。

pML48の挿入塩基配列は配列表の配列番号1に示される。配列表の配列番号2に示される塩基配列は、配列番号2に示される塩基配列に対して完全に相補的である。通常ゲノムDNAの塩基配列は同種内において遺伝的多型 (ポリモルフィズム: polymorphism) を有している。また、DNAクローニングの過程及び塩基配列決定の過程において、ヌクレオチドの置換等が一定の確率で生じ得る。従って、本発明は、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするML-236B生合成関連DNA、及び配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするML-236B生合成関連DNAをも包含する。これらDNAとしては、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列に1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加が生じたもの、並びにペニシリウム・シリナム SANKI 3380株以外のML-236B生産菌に由来するものであり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善する機能を有するものをも包含する。なお、本発明において、ハイブリダイズとは、2本の一本鎖核酸同士が互いに相補的な領域又は相補性の高い領域において二本鎖を形成することをいい、ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション液の組成が6×SSC (1×SSCの組成は、150 mM NaCl, 15 mMクエン酸三ナトリウム。) であり且つハイブリダイゼーションを行なう際の保温温度が55°Cの場合

をいう。

ML-236B生合成関連DNAの解析法は次の1)乃至3)に従う。

1) 遺伝子解析ソフトによる解析

ゲノムDNA配列中の遺伝子領域の推定は、既存の遺伝子解析プログラム(Gene Findingプログラム(以下、「GRAIL」という。))、及び配列の相同性検索プログラム(BLASTN及びBLASTX)により行なうことができる。

GRAILはゲノム配列の「遺伝子配列らしさ」を評価する7つのパラメータに分割し、それらの結果をニューラルネット法を用いて統合することにより、ゲノムDNA上の構造遺伝子を検索するプログラム(Uberbacher, E. C. & Mural, R. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 11261(1991)記載)であり、Apocom GRAIL Toolkit (APOCOM社製)が好適に使用される。

BLASTは核酸配列及びアミノ酸配列の相同性検索を行なうアルゴリズム(Altechul, S. F., Madden, T. L., et al., Nucl. Acids Res., 25, 3389(1997)記載)を用いたプログラムである。

ゲノムDNA配列を適當な長さに分割し、BLASTNを用いて遺伝子データベースに対し相同性検索することにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向を推定することができる。また、分割されたゲノムDNA配列を6つの翻訳フレーム(センス配列及びアンチセンス配列に各々3つずつ)に従ってアミノ酸配列に翻訳し、該アミノ酸配列のペプチド・データベースに対する相同性検索をBLASTXを用いて行なうことにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向の推定を行なうこともできる。さらに、真核生物においては、ゲノムDNA配列中に含まれる構造遺伝子のコード領域がイントロン配列により分断されている場合があり、このようなギャップを有する構造遺伝子の解析にはギャップ含有配列用のBLASTがより有効であり、Gapped-BLAST(BLAST2:WISCONSIN GCG package ver. 10.0に搭載)が好適に使用される。

2) ノーザンプロット・ハイブリダイゼーション法による解析

ノーザンプロット・ハイブリダイゼーション法により、1) 記載の解析法により推定される構造遺伝子の発現を調べることができる。

ノーザンプロットに供するML-236B生産菌の全RNAは、該菌の培養物より得ることができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シリナムの培養は、該菌のスラントからMGB3-8培地に該菌を接種し、22乃至28°C、1乃至4日間、振盪しつつ保温することにより行うことができる。

ML-236B生産菌からのRNAの抽出は、通常全RNAを調製するのに使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホットフェノール法、グアニジン・チオシアネートーグアニジン・塩酸法等が挙げられる。また、より純度の高い全RNAを調製するための市販キットとしては、例えば、RNasey Plant Mini Kit(キアゲン社製)等が挙げられる。さらに、mRNAは、全RNAをオリゴ(dT)カラムに添加し、該カラムに吸着した画分を回収することにより得ることができる。

RNAのメンブレンへのトランスファー、プローブの調製、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、上述のサザンプロット・ハイブリダイゼーションと同様に行なうことができる。

3) 5' -末端及び3' -末端の解析

各構造遺伝子の5' -末端及び3' -末端の解析は、RACE(rapid amplification of cDNA ends)法により行なうことができる。RACEは、mRNAを録型とし、塩基配列が決定されている領域から塩基配列が決定されていない5' -末端又は3' -末端領域までを含むcDNAを、RT-PCRの応用により取得する方法である(Frohman, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 8998(1988)記載)。

5' RACEは以下の方法に従う。mRNAを録型とし、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA(1)をプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、ターミナルデオキシヌクレオチデルransフェラーゼにより該cDNA第一鎖の3' -末端にホモポリメリックな(homopolymeric: 単一塩基からなる)ヌクレオチド鎖

を付加させる。該 c DNA 第一鎖を鋳型とし且つ該ホモポリメリックな塩基配列に相補的な塩基配列を含むセンス側のオリゴDNA、及び、アンチセンス側に存在し且つオリゴDNA(1)より3'一側に存在するオリゴDNA(2)をプライマーとしたPCRによって、5'一末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である(Frohman, M. A., Methods in Enzymol., 218, 340(1993)記載)。5'RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Version 2.0 (GIBCO社製)等が好適に使用される。

3'RACEは、mRNAの3'一末端に存在するポリA領域を利用する方法である。すなわち、mRNAを鋳型として、オリゴd(T)アダプターをプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、該cDNA第一鎖を鋳型として、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたセンス側のオリゴDNA(3)、及び、アンチセンス側のオリゴd(T)アダプターをプライマーとしたPCRによって、3'一末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である。3'RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Ready-To-Go T-primed First-Strand Kit (Pharmacia社製)が好適に使用される。

RACEにおける塩基配列中の公知の部分に基いたプライマーの設計には、上記1)及び2)の解析結果が好適に利用できる。

以上、1)乃至3)に記載した解析法により、ゲノムDNA配列上の構造遺伝子の方向、並びに、構造遺伝子中の転写開始点の位置、翻訳開始コドンの位置、翻訳終止コドン及びその位置を推定することができる。これらの情報に基づいて、各構造遺伝子及びそのcDNAを取得することが可能である。

本発明において得られた組換えDNAベクター pML48挿入配列上には、6つの構造遺伝子の存在が推定され、それぞれをm1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE及びm1cRと命名した。このうち、m1cA、m1cB、m1cE及びm1cRは配列表の配列番号2に示される塩基配列上にコード領域

を有し、 $m_1 c_C$ 及び $m_1 c_D$ は配列表の配列番号 1 に示される塩基配列上にコード領域を有しているものと推定された。

cDNA の取得法としては、上述の情報に基づいて設計され得るプライマーを用いた RT - PCR によるクローニング、かかる情報に基いて得られる DNA プローブを用いた cDNA ライブラリーからのクローニング等が挙げられる。

これらの方法で取得できる cDNA を機能発現させるためには、完全長の cDNA を得る必要がある。また、RT - PCR により機能発現し得る cDNA を取得するためには、該 RT - PCR 産物が本来の位置に翻訳開始コドンを含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないようにプライマーを設計することが必須である。

PCR 用プライマー X 1 (X は A、C、E、G、I 及び K のいずれかより選択され、A 1 は (13)、C 1 は (21)、E 1 は (29)、G 1 は (37)、I 1 は (45)、K 1 は (53) に記載されている。) 又は PCR 用プライマー Y 1 (Y は B、D、F、H、J 又は L のいずれかより選択され、B 1 は (17)、D 1 は (25)、F 1 は (33)、H 1 は (41)、J 1 は (49)、L 1 は (57) に記載されている。) は配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 に示される塩基配列中の少なくとも 10 個の塩基からなる塩基配列を有する。

PCR 用プライマーの有する塩基配列は、鋳型鎖と選択的にアニーリングし且つ PCR 又は RT - PCR のプライマーとして機能し得る限りにおいては、該鋳型鎖の一部と完全に相補的でなくてもよい。

PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 (X は A、C、E、G、I 及び K のいずれかより選択され、A 2 は (14)、A 3 は (15)、A 4 は (16)、C 2 は (22)、C 3 は (23)、C 4 は (24)、E 2 は (30)、E 3 は (31)、E 4 は (32)、G 2 は (38)、G 3 は (39)、G 4 は (40)、I 2 は (46)、I 3 は (47)、I 4 は (48)、K 2 は (54)、K 3 は (55)、K 4 は (56) に記載されている。) は PCR 用プライマー X 1 (X 1 及び X 2 乃至 X 4 の X は同じアルファベットのグループを表わす; A 1 には A 2 乃至 A 4、C 1 には C 2 乃至 C 4、E 1 には E 2 乃至 E 4、G 1 には G 2 乃至 G 4、I 1 に

はI 2乃至I 4、K 1にはK 2乃至K 4が、それぞれ対応する。) の塩基配列と70%以上の相同性を有し、好適には80%以上の相同性を有し、より好適には90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含む。

PCR用プライマーY 2乃至Y 4 (YはB, D, F, H, J又はLのいずれかより選択され、B 2は(18)、B 3は(19)、B 4は(20)、D 2は(26)、D 3は(27)、D 4は(28)、F 2は(34)、F 3は(35)、F 4は(36)、H 2は(42)、H 3は(43)、H 4は(44)、J 2は(50)、J 3は(51)、J 4は(52)、L 2は(58)、L 3は(59)、L 4は(60)に記載されている。) はPCR用プライマーY 1 (Y 1及びY 2乃至Y 4のYは同じアルファベットのグループを表わす; B 1にはB 2乃至B 4、D 1にはD 2乃至D 4、F 1にはF 2乃至F 4、H 1にはH 2乃至H 4、J 1にはJ 2乃至J 4、L 1にはL 2乃至L 4が、それぞれ対応する。) の塩基配列と70%以上の相同性を有し、好適には80%以上の相同性を有し、より好適には90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含む。

PCR用プライマーX 1乃至X 4 (XはA, C, E, G, I及びKのいずれかより選択される。) のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4 (YはB, D, F, H, J又はLのいずれかより選択される。) のいずれか一つをプライマーとしてPCR又はRT-PCRを行なうことができる。

上述の通り、本発明において得られた組換えDNAベクター pML48挿入配列上には、6つの構造遺伝子 (m1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE及びm1cR) の存在が推定された。これらの6つの構造遺伝子のcDNAは、逆転写反応並びに該PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つによるPCRを組み合せたRT-PCRにより取得することができる。また、各構造遺伝子は、PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つをプライマーとし、ML-236B生産菌のゲノムDNAを錆型としたPCRにより取得することができる。

完全長であり且つ適当な宿主細胞において発現し得るcDNAを取得するため

のPCR用プライマーとしては、次の①において述べる、PCR用プライマーX₁乃至X₄のいずれか一つ及びPCR用プライマーY₁乃至Y₄のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

①m₁cAのcDNAの取得には、PCR用プライマーA₁乃至A₄のいずれか一つ、及びPCR用プライマーB₁乃至B₄のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m₁cBのcDNAの取得には、PCR用プライマーC₁乃至C₄のいずれか一つ、及びPCR用プライマーD₁乃至D₄のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m₁cCのcDNAの取得には、PCR用プライマーE₁乃至E₄のいずれか一つ、及びPCR用プライマーF₁乃至F₄のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m₁cDのcDNAの取得には、PCR用プライマーG₁乃至G₄のいずれか一つ、及びPCR用プライマーH₁乃至H₄のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m₁cEのcDNAの取得には、PCR用プライマーI₁乃至I₄のいずれか一つ、及びPCR用プライマーJ₁乃至J₄のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m₁cRのcDNAの取得には、PCR用プライマーK₁乃至K₄のいずれか一つ、及びPCR用プライマーL₁乃至L₄のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

さらに、PCR用プライマーX₁乃至X₄には以下の②の要件が伴う。

②PCR用プライマーX₁乃至X₄は、該PCR用プライマーX₁乃至X₄のいずれか一つ及びPCR用プライマーY₁乃至Y₄のいずれか一つをプライマーとしたPCR産物が本来の位置に翻訳開始コドンa t gを含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないよう設計される（なお、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列及び配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至3

4203に示される塩基配列における、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳開始コドンの位置は、表4に記載されている)。

PCR用プライマーX1はcDNAの翻訳開始コドンatg中のa又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする。

PCR用プライマーX2乃至X4は配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする(配列表の配列番号2の全塩基配列は、配列表の配列番号1の全塩基配列に対して完全に相補的である。)。

PCR用プライマーX2乃至X4が翻訳開始コドンatgより3'一側の塩基配列を含む場合、翻訳開始コドンatgより3'一側の塩基配列上に開始コドンatgから始まる翻訳フレーム中に終始コドンとなるような塩基配列(taa、tag又はtga)は含まれない。なお、開始コドンatgから始まる翻訳フレームとは、翻訳開始コドンatgより3'一側の塩基配列を翻訳開始コドンatgから3塩基単位に分割したときに生じる3塩基からなる配列をいう。

PCR用プライマーX2乃至X4が、翻訳開始コドンのa、at又はatg(「塩基又は塩基配列m」という。)にその位置で対応する塩基又は塩基配列(「塩基又は塩基配列m」という。)を含む場合、塩基又は塩基配列mがaのとき、塩基又は塩基配列m'はaであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のaは、該PCR用プライマーX2乃至X4の3'一末端に位置する。塩基又は塩基配列mがatのとき、塩基又は塩基配列m'はatであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のatは、該PCR用プライマーX2乃至X4の3'一末端に位置する。塩基又は塩基配列mがatgのとき、塩基又は塩基配列m'はatgであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のatg中のaを1番目として3'一方向に数えて $3 \times n + 1$ (nは1以上の整数)番目のヌクレオチドを5'一末端とするトリヌクレオチドが該PCR用プライマーX2乃至X4に存在する場合、該トリヌクレオチドの塩基配列がtaa、tag及びtgaのいずれかであることはない。

PCR用プライマーX2乃至X4の3'一末端が、翻訳開始コドンatg中の

aを1番目として3'ー方向に数えて $3 \times n + 1$ (nは1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、該PCR用プライマーX 2乃至X 4を一方のプライマーとし、ML-236B生産菌のRNA若しくはmRNAを録型とするRT-PCR産物又はゲノムDNA若しくはcDNAを録型とするPCR産物において、 $3 \times n + 1$ 番目のヌクレオチド及びその3'ー側に隣接するジヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列がt a a、t a g及びt g aのいずれかであることはない。

PCR用プライマーX 2乃至X 4のいずれか一つの3'ー末端が、翻訳開始コドンa t g中のaを1番目として3'ー方向に数えて $3 \times n + 2$ (nは1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、該PCR用プライマーX 2乃至X 4を一方のプライマーとし、ML-236B生産菌のRNA若しくはmRNAを録型とするRT-PCR産物又はゲノムDNA若しくはcDNAを録型とするPCR産物において、 $3 \times n + 2$ 番目のヌクレオチド及びその3'ー側並びに5'ー側に隣接する2つのモノヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列がt a a、t a g及びt g aのいずれかであることはない。

PCR用プライマーX 2乃至X 4の3'ー末端が、翻訳開始コドンa t g中のaを1番目として3'ー方向に数えて $3 \times n + 3$ (nは1以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、 $3 \times n + 1$ 乃至 $3 \times n + 3$ 番目のヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列がt a a、t a g及びt g aのいずれかであることはない。

以上が②の要件である。

また、PCR用プライマーY 1乃至Y 4には以下の③の要件が伴う。

③PCR用プライマーY 1乃至Y 4は、PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及び該Y 1乃至Y 4のいずれか一つをプライマーとするPCRにより、各構造遺伝子 (m1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE及びm1cR) にコードされるペプチドのN末端からC末端までをコードしたcDNAを増幅できるように設計される。

PCR用プライマーY 1は、cDNA上の翻訳終止領域附近の塩基配列に対し

て相補的な塩基配列を有する PCR用プライマーであれば特に限定されないが、好適には翻訳終止コドンの 3' - 末端の塩基に対して相補的な塩基又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする塩基配列を有し、より好適には翻訳終止コドンに対して相補的な 3 塩基の配列を有する（なお、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳終止コドン、該翻訳終止コドンの相補配列、各構造遺伝子にコードされるペプチドの C 末端のアミノ酸残基、該アミノ酸残基をコードした塩基配列、並びに、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 3 4 2 0 3 に示される塩基配列及び配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 1 乃至 3 4 2 0 3 に示される塩基配列におけるそれらの位置は、表 8 乃至 1 0 に記載されている）。

PCR用プライマー Y 2 乃至 Y 4 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 3 4 2 0 3 に示される塩基配列上又は配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 1 乃至 3 4 2 0 3 に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする。

以上が③の要件である。

さらに、PCR用プライマー X 2 乃至 X 4 及び PCR用プライマー Y 2 乃至 Y 4 は、上述の定義及び②及び③記載の要件を満たす限りにおいて、それぞれの 5' - 末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーが PCR に使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR 産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

また、PCR用プライマー X 1 乃至 X 4 及び PCR用プライマー Y 1 乃至 Y 4 の設計は、前述の PCR用プライマーの設計に関する記述に従って行なう。

陽性クローンの保有する組換えDNAベクターの機能発現は、該組換えDNAベクターで細胞を形質転換し、該形質転換細胞の ML - 2 3 6 B 生産能を測定することにより行なうことができる。機能発現を行なう細胞としては、上述の ML - 2 3 6 B 生産菌又は ML - 2 3 6 B 非生産菌を用いることができる。ML - 2 3 6 B 非生産菌としては、該DNAベクターで形質転換される細胞であれば特に

限定されないが、例えば、上述のML-236B生産菌の非生産変異株等が挙げられる。該変異株に形質転換することによりML-236Bの生産が回復すれば、該組換えDNAベクターが所望の機能を有すると推定することができる。

機能発現のための形質転換法は、宿主細胞に依存して適宜選択される。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シリナムの形質転換は、ペニシリウム・シリナムの胞子からプロトプラストを調製し、該プロトプラストに組換えDNAベクターを導入することにより行なうことができる (Nara, F., et al., *Curr. Genet.* 23, 28 (1993) 記載)。

プロトプラストの調製は以下の方法による。

ペニシリウム・シリナムを培養したスレントからPGA寒天培地のプレートへ該菌を接種し、22乃至28°C、10乃至14日間保温し、該プレートから胞子を回収し、該胞子 1×10^7 乃至 1×10^9 個を50乃至100mlのYPD-20培地（組成；0.1% (w/v) イーストエキストラクト (Difco 社製)、0.5% (w/v) ポリペプトン (日本製薬(株) 製)、20% (w/v) ラクトース、pH 5.0）に接種し、22乃至28°C、18時間乃至2日間保温する。該培養物から発芽胞子を回収し、細胞壁分解酵素で処理し、プロトプラストを得る。細胞壁分解酵素としては、ペニシリウム・シリナムの細胞壁を分解するものであり且つ該菌に有害な作用を及ぼさないものであれば特に限定されないが、例えば、ザイモリアーゼ、キチナーゼ等が挙げられる。

形質転換されたML-236B生産菌の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができるが、好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シリナムの形質転換体の場合は、ML-236Bを生産させる前に、形質転換された該菌のプロトプラストを適当な条件下で培養することにより予め細胞壁を再生させておく。

該細胞壁の再生は、形質転換したペニシリウム・シリナムのプロトプラストを封入したVGS中層寒天培地（組成；Vogel 最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2% (w/v) 寒天）をVGS下層寒天培地（組成；Vogel 最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2.7% (w/v) 寒

天) 及び V G S 上層寒天培地 (組成: Vogel 最小培地、2% (w/v) グルコース、1M グルシトール、1.5% (w/v) 寒天) で挟み、22 乃至 28°C、7 乃至 15 日間保温することにより行なうことができる。得られた菌株は P G A 培地上で、22 乃至 28°C で保温しつつ継代培養する。該菌株を P G A 培地で作製したスラントに白金耳を用いて接種し、22 乃至 28°C、10 乃至 14 日間保温し、0 乃至 4°C で保存する。

上述の通り細胞壁を再生させたペニシリウム・シリナムの形質転換体を培養したスラントから、M B G 3-8 培地へ該形質転換体を接種し、22 乃至 28°C、7 乃至 12 日間、振盪しつつ保温することにより、ML-236B を効率よく生産することができる。なお、宿主細胞のペニシリウム・シリナムについても、全く同様の液体培養により ML-236B を生産させることができる。

ML-236B 生産菌の培養物からの ML-236B の精製は、通常天然物の精製に使用される諸技法を組み合わせることによりなされる。該諸技法としては、特に限定されないが、例えば、遠心分離、濾過による固液分離、アルカリ又は酸処理、有機溶媒による抽出、転溶、吸着及び分配等の各種クロマトグラフィー、結晶化等が挙げられる。ML-236B は、ヒドロキシ酸体とラクトン体の両方の形をとり、相互に変換し、更に、ヒドロキシ酸体は安定な塩を形成する。このような物理化学的特質を利用して、ML-236B のヒドロキシ酸体 (以下、「遊離型ヒドロキシ酸」という。) 、ML-236B のヒドロキシ酸塩 (以下、「ヒドロキシ酸塩」という。) 、又は ML-236B のラクトン体 (以下、「ラクトン」という。) を得ることができる。

該培養物を、加熱下又は常温下でアルカリ加水分解することにより開環し、ヒドロキシ酸塩に変換し、該反応溶液を酸性にした後濾過し、濾液を水と混和しない有機溶媒で抽出することにより、目的化合物を遊離型ヒドロキシ酸として得ることができる。水と混和しない有機溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、メチレンクロリド、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、蟻酸エチル、酢酸エチル等のエステル類、

それら2種以上の混合溶媒等が挙げられる。

また、この遊離型ヒドロキシ酸を、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属塩類の水溶液に転溶することにより、目的化合物をヒドロキシ酸塩として得ることができる。

さらに、この遊離型ヒドロキシ酸を、有機溶媒中で加熱して脱水するか、又は他の方法により閉環することにより、目的化合物をラクトンとして得ることができる。

このようにして得ることができる遊離型ヒドロキシ酸、ヒドロキシ酸塩及びラクトンは、カラムクロマトグラフィー等により精製、単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーの担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、セファデックス LH-20 (Pharmacia社製)、ダイヤイオン HP-20 (三菱化学(株)製)、シリカゲル、逆相系担体等が挙げられ、好適にはC18系の担体である。

ML-236Bの定量法としては、通常有機化合物の定量に用いられる方法であれば特に限定されないが、例えば、逆相高性能クロマトグラフィー (reverse phase high performance liquid chromatography:以下、「逆相HPLC」という。) 法等が挙げられる。逆相HPLC法による定量は、ML-236B生産菌の培養物をアルカリ加水分解し、可溶性画分をC18カラムを用いた逆相HPLCに供し、紫外吸収を測定し、該吸収を定量化することにより行なうことができる。C18カラムとしては、通常の逆相HPLCに使用されるC18カラムであれば特に限定されないが、例えば、SSC-ODS-262 (直径6mm、長さ100mm:センシュー科学(株)製) 等が挙げられる。移動相としては、通常逆相HPLCに使用される溶媒であれば特に限定されないが、例えば、75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸等が挙げられる。移動相に流速2ml/分の75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸を用いてSSC-ODS-262カラムにML-236Bを室温で添加すると、4.0分後に溶出される。ML-236Bの検出は、HPLC用UV検

出器を用いて行なうことができ、UV検出器の吸収波長は、220乃至280nmであり、好適には220乃至260nm、より好適には236nmである。

機能発現が確認された遺伝子を有する所望の組換えDNAベクターは、ML-236Bの生産性の改善に有用である。

なお、本明細書においては、アデニンを「a」、グアニンを「g」、チミンを「t」、シトシンを「c」とそれぞれ記載する。配列表の各配列番号に示される塩基配列は、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン（特許庁刊行、平成10年6月）」に従って記載した。

「図面の簡単な説明」

図1：大腸菌及び糸状菌に導入させることができ且つ長いDNAを挿入することができるDNAベクターpSAKcos1の構築図。

図2：pML48挿入配列の構造遺伝子解析。

図3：pML48挿入配列のノーザンプロット・ハイブリダイゼーション。

「発明を実施するための最良の形態」

以下に実施例及び試験例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例1. pSAKcos1ベクターの作製

1) 大腸菌由来のハイグロマイシンBホスフォトランスクレオチド遺伝子をもつプラスミドpSAK333（特開平3-262486号公報記載）を制限酵素BamHI（宝酒造（株）製）で消化し、T4DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）で末端を平滑化した。

2) DNA ligation kit Ver. 2（宝酒造（株）製）を用いて上記DNA断片を自己環状化し、大腸菌のコンピーテント・セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換した。形質転換大腸菌からBamHI部位を欠失したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAK

360と命名した。

3) pSAK360を制限酵素PvuIIで消化した後、アルカリリフォスファターゼ処理を行い、5'末端の脱リン酸化を行なった。コスミドベクターpWE15(STRATAGENE社製)からコス(cos)部位を含む[Sall-ScaI]断片(約3kb)を取得し、T4DNAポリメラーゼにより末端を平滑化した後、pSAK360のPvuII部位に連結し、JM109株を形質転換した。該形質転換大腸菌から[Sall-ScaI]断片(約3kb)をPvuII部位に挿入したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAKcos1と命名した。pSAKcos1は、pWE15由来のBamHI、EcoRI及びNotIの各制限酵素認識部位を1つずつ有する。また、pSAKcos1は選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有している。以下の実施例において、大腸菌を宿主とする場合、pSAKcos1又は外来DNAを挿入したpSAKcos1による形質転換体の選択は、40μg/mlのアンピシリンを培地に添加して行なった。ペニシリウム・トリナム SANK13380を宿主とする場合、pSAKcos1又は外来DNAを挿入したpSAKcos1による形質転換体の選択は、200μg/mlのハイグロマシシンB(hygromycin B)を培地に添加して行なった。

pSAKcos1の構築手順を図1に記載した。

実施例2. ペニシリウム・トリナム SANK13380株のゲノムDNAの調製

1) ペニシリウム・トリナム SANK13380株の培養

ペニシリウム・トリナム SANK13380株の種菌の培養はPGA寒天培地を用いたスラントにて行なった。すなわち、ペニシリウム・トリナム SANK13380株を白金耳により接種し、26°Cにて14日間保温した。このスラントは4°Cで保存した。

本培養は、液体通気培養にて行なった。上述のスラント5mm角の菌体を50

m l の M B G 3 - 8 培地を入れた 5 0 0 m l 容の三角フラスコに接種し、 2 6 °C、 2 1 0 r p m の条件下で 5 日間振盪培養した。

2) ペニシリウム・シリナム S A N K 1 3 3 8 0 株の培養物からのゲノム DNA の調製

1) の培養物を、 室温、 1 0 0 0 ×G の条件下で 1 0 分間遠心分離し、 菌体を回収した。 湿重量 3 g の菌体を、 ドライアイスで冷却した乳鉢上で粉末になるまで破碎した。 菌体破碎物を 2 0 m l の 6 2 . 5 mM EDTA · 2 Na (和光純薬 (株) 製) - 5 % (w/v) SDS - 5 0 mM Tris (和光純薬 (株) 製) - 塩酸 (和光純薬 (株) 製) 緩衝液 (pH 8. 0) で満たした遠心管に入れ、 穏やかに混合した後、 0 °C にて 1 時間静置した。 1 0 mM Tris - 塩酸 - 0. 1 mM EDTA · 2 Na (pH 8. 0 : 以下「TE」という。) で飽和した 1 0 m l のフェノールを添加し、 5 0 °C にて 1 時間穏やかに攪拌した。 室温、 1 0 0 0 0 ×G の条件下で 1 0 分間遠心分離した後、 1 5 m l の上層 (水相) を別の遠心管にとり、 0. 5 倍容の TE 飽和フェノール及び 0. 5 倍容のクロロホルム溶液を加え、 2 分間穏やかに攪拌した後、 室温、 1 0 0 0 0 ×G の条件下で 1 0 分間遠心分離した (以下、「フェノール・クロロホルム抽出」という。)。 1 0 m l の上層 (水相) に 1 0 m l の 8 M 酢酸アンモニウム (pH 7. 5) 及び 2 5 m l の 2 - プロパノール (和光純薬 (株) 製) を添加し、 - 8 0 °C にて 1 5 分間冷却した後、 4 °C、 1 0 0 0 0 ×G の条件下で 1 0 分間遠心分離した。 沈殿を 5 m l の TE に溶解させた後、 2 0 μl の 1 0 mg / m l リボヌクレアーゼ A (Sigma 社製) 及び 2 5 0 単位の リボヌクレアーゼ T 1 (G I B C O 社製) を添加し、 3 7 °C にて 2 0 分間保温した。 これに 2 0 m l の 2 - プロパノールを添加し、 穏やかに混合した後、 糸状のゲノム DNA をパスツールピペットの先端に巻きつけ、 1 m l の TE に溶解させた。 このDNA溶液に 0. 1 倍容の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 6. 5) 及び 2. 5 倍容のエタノールを加え、 - 8 0 °C にて 1 5 分冷却した後、 4 °C、 1 0 0 0 0 ×G の条件下で 5 分間遠心分離した (以下、「エタノール沈殿」という。)。 得られた沈殿を 2 0 0 μl の TE に溶解し、 ゲノム DNA 画分とした。

実施例3. ペニシリウム・シリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラーの作製

1) ゲノムDNA断片の調製

実施例2において得られたペニシリウム・シリナム SANK13380株のゲノムDNA ($50 \mu\text{g}$) を含む $100 \mu\text{l}$ の水溶液に、0.25単位のSau3A I (宝酒造(株) 製) を添加した後、10、30、60、90及び120秒経過後に $20 \mu\text{l}$ ずつサンプリングし、各サンプルに $20 \mu\text{l}$ ずつの0.5M EDTA (pH 8.0) を加えて制限酵素反応を停止した。アガロースゲル電気泳動により、得られた部分消化DNA断片を分離し、 30 kbp 以上の大さをもつDNA断片を含むアガロースゲルを回収した。

回収したゲルを細かく碎き、ウルトラフリーC3遠心式ろ過ユニット(日本ミリポア(株) 製)に入れた。 -80°C にて15分間冷却し、ゲルを凍結した後、 37°C にて10分間保温してゲルを融解した。 $5000 \times G$ 、5分間遠心分離し、DNA抽出液を得た。このDNA抽出液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行ない、得られた沈殿を少量のTEに溶解した。

2) DNAベクター pSAKcos1の前処理

pSAKcos1を制限酵素BamHI(宝酒造(株) 社製)により消化した後、 65°C にて30分間アルカリリフォスファターゼ(宝酒造(株) 製)反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行ない、得られた沈殿を少量のTEに溶解した。

3) ライゲーション及びin vitroパッケージング

上記1)記載のゲノムDNA断片($2 \mu\text{g}$)及び上記2)記載の前処理済みpSAKcos1($1 \mu\text{g}$)を混合し、DNA ligation kit Ver. 2(宝酒造(株) 製)を用い、 16°C にて16時間ライゲーション反応を行なった。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿を行ない、得られた沈殿を $5 \mu\text{l}$ のTEに溶解させた。ライゲーション生成物溶液を、GIGAPAK II Gold (STRATAGENE社製)キッ

トを用いた *in vitro* パッケージングに供し、組換えDNAベクターを含む形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌のコロニーを形成させたプレートに 3 ml の LB 培地を注ぎ、セルスクレーパーを用いてプレート上のコロニーを回収した（回収液 1 という）。さらに 3 ml の LB 培地でプレートを洗浄、回収した（回収液 2 という。）。回収液 1 及び 2 の混合液にグリセリンを終濃度 18 % なるよう加えたものを大腸菌菌体液と称し、ペニシリウム・シリナム SANK 13380 株のゲノム DNA ライブラリーとして、-80 °C にて保存した。

実施例 4. ペニシリウム・シリナム SANK 13380 株のゲノム DNA を
鋳型とした PCR による PKS 遺伝子断片の増幅

1) PCR 用プライマーの設計及び合成

アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*) の PKS 遺伝子のアミノ酸配列 (Brown, D. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載) に基づき、配列表の配列番号 3 及び 4 に示されるミックス・プライマーを設計した。

配列表の配列番号 3 : gayacngcntgyasttc

配列表の配列番号 4 : tcnccnknrcwgtgncc

なお、配列表の配列番号 3 及び 4 に示される塩基配列において、n はイノシンの塩基 (ヒポキサンチン) を、y は t 又は c を、s は g 又は c を、k は g 又は t を、r は g 又は a を、w は a 又は t を、それぞれ表わす。

2) PCR による DNA 断片の増幅

上記 2) 記載の PCR 用プライマー (各 100 pmol) 、実施例 2 で得られたペニシリウム・シリナム SANK 13380 株のゲノム DNA (500 ng) 、0.2 mM dATP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dGTP、0.2 mM dTTP、50 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化マグネシウム及び 1.25 単位の Ex. Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製) を含む 50 μl の反応液を、94 °C にて 1 分間、58 °C にて 2 分間、70 °C にて 3 分間、の連続する 3 工程からなるサイクル反応に供した。このサイクルを 30 回繰り返

すことによりDNA断片を増幅した。PCRは、Takara PCR Thermal Cycler MP TP3000（宝酒造（株）製）を使用して行った。

増幅されたDNA断片を、アガロースゲル電気泳動に供した後、約1.0乃至2.0 kbの大きさをもつDNA断片を含むアガロースゲルを回収した。ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

3) ライグーション及び形質転換

2) 得られたDNA断片、及び、TAクローニング・システムpCR2.1 (Invitrogen社製) を用いて、このキットに含まれるプラスミドpCR2.1にライグーションし、形質転換株を得た。

得られたクローンを数個選び、マニアティスら (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) の方法に従って培養した。すなわち、2 mlのLB培地を含む24 ml容の試験管に各コロニーを接種し、37°Cにて18時間、振盪培養した。

この培養物からの組換えDNAベクターの調製は、アルカリ法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) に従った。すなわち、1.5 mlの培養液を、室温、10000×Gの条件下で2分間遠心分離し、沈澱より菌体を回収した。菌体に100 μlの50 mM グルコースー25 mM Tris-塩酸ー10 mM EDTA (pH 8.0) を加えて懸濁し、200 μlの0.2規定水酸化ナトリウムー1% (w/v) SDSを加えて穏やかに攪拌し、溶菌させた。これに150 μlの3M 酢酸カリウムー11.5% (w/v) 冰酢酸を加えてタンパク質を変成させ、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離し、上清を回収した。上清について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を40 μg/mlのリボヌクレアーゼA (Sigma社製) を含有する50 μlのTEに溶解させた。

各組換えDNAベクターを制限酵素消化して電気泳動に供し、電気泳動パターンの異なる組換えDNAベクター中の挿入塩基配列を、DNAシークエンサー（モデル377：パーキンエルマー・ジャパン社製）を用いて決定した。

その結果、PKS遺伝子断片を含む組換えDNAベクターを保有する株の存在が確認された。

実施例5. ペニシリウム・シリナム SANK13380株のゲノミック・サンプロットハイブリダイゼーション

1) 電気泳動及びメンブレンへのトランスファー

実施例2において得られたペニシリウム・シリナム SANK13380株のゲノムDNA ($10\ \mu g$) を、制限酵素EcoRI、SalI、HindIII又はSacI（いずれも宝造（株）製）を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲルの調製には、Agarose L03「TAKARA」（宝酒造（株）製）を用いた。泳動後、ゲルを0.25規定塩酸（和光純薬（株）製）に浸し、室温にて10分間穏やかに振盪した。このゲルを0.4規定水酸化ナトリウム（和光純薬（株）製）中に移し、室温にて30分間穏やかに振盪した。マニアティスらのアルカリトランスファー法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) により、ゲル中のDNAをナイロン・メンブレンHybondTM-N+（アマシャム社製）にトランスファーし、固定した。メンブレンを2×SSC（1×SSCの組成は、150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム）で洗浄した後風乾した。

2) ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出

1). 得られたメンブレンに対し、実施例4で得られたPKS遺伝子断片をプローブとして用いたハイブリダイゼーションを行なった。

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA ($1\ \mu g$) をDIG DNA Labelling Kit（ベーリンガー・マンハイム社製）で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

ハイブリダイゼーション液 (DIGイージーハイブ: ベーリンガー・マンハイム社製) に 1) 記載のメンブレンを浸し、20 rpmで振盪しつつ、42°Cにて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に添加し、マルチシェーカー・オープンHB (TAITEC社製) を用い、20 rpmで振盪しつつ42°Cにて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた55°C、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

洗浄したメンブランをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製) で処理し、X線フィルム (ルミフィルム: ベーリンガー・マンハイム社製) に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサー FPM800A (Fuji Film社製) を用いて行なった。

その結果、実施例4において得られたPKS遺伝子断片はペニシリウム・シリナムのゲノム上に存在することが確認された。

実施例6. PKS遺伝子断片をプローブとしたペニシリウム・シリナム SA NK13380株のゲノムDNAライプラリーのスクリーニング

PKS遺伝子を含むゲノムDNAのクローニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行なった。

1) メンブレンの調製

ペニシリウム・シリナム SANK13380株のゲノムDNAライプラリーとして保存した大腸菌菌体液 (実施例3記載) を、LB寒天培地のプレートに、プレート1枚あたり5000乃至10000個のコロニーが生育するよう希釀して撒いた。このプレートを26°Cにて18時間保温した後、4°Cにて1時間冷却した。HybondTM-N+ (アマシャム社製) をプレートにのせ、1分間接触させた。コロニーを付着させたメンブレンをプレートから注意深く離し、コロニー接触面を上にして、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5規定

水酸化ナトリウムに7分、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5M Tris-塩酸-1mM EDTA (pH 7.5) に3分ずつ2回浸した後、400mlの2×SSCで洗浄した。洗浄したメンブレンを30分風乾した。

2) ハイブリダイゼーション

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA (1 μg) をDIG DNA Labeling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

ハイブリダイゼーション液 (DIGイージーハイブ: ベーリンガー・マンハイム社製) に1) 記載のメンブレンを浸し、20 rpmで振盪しつつ、42°Cにて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に加え、マルチシェーカー・オープンHB (TAITEC社製) を用い、20 rpmで振盪しつつ42°Cにて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた68°C、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

洗浄したメンブランをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製) で処理し、X線フィルム (ルミフィルム: ベーリンガー・マンハイム社製) に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A: Fuji Film社製) を用いて行なった。

以上、1) 及び2) 記載の操作をスクリーニングという。

一回目のスクリーニングで陽性シグナルが検出されたクローンのコロニー周辺をかきとってLB培地に懸濁した後、適宜希釈してプレートに撒いて培養し、同様に二回目のスクリーニングを行ない、陽性クローンを純化した。

なお、本実施例で得られた陽性クローン、すなわち形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199は、平成11年(1999年)7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号)に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付さ

れた。

実施例7. 組換えDNAベクターpML48の挿入配列の解析(1)

実施例6で得られたE. coli i pML48 SANK71199株の培養及び該培養物からの組換えDNAベクターの調製は、実施例4記載の方法に準じて行なった。

得られた組換えDNAベクターをpML48と命名した。pML48挿入配列を各種制限酵素消化し、pUC119(宝酒造(株)製)に組込むことにより、サブクローニングした。得られたサブクローンをプローブとして、実施例5記載の方法に準じてサザンプロット・ハイブリダイゼーションを行なった。すなわち、pML48の各種制限酵素消化物を電気泳動に供し、DNAをメンブレンヘトラスファーしたものに対して、ハイブリダイゼーションを行なった。

その結果、pML48挿入配列の制限酵素地図が作成された。

また、上述の各サブクローンの挿入配列の塩基配列を、DNAシークエンサー モデル377(パーキンエルマー・ジャパン社製)を用いて決定し、pML48の全塩基配列を決定した。

pML48の挿入配列は全34203塩基であった。

pML48の挿入配列の塩基配列は、配列表の配列番号1及び2に記載されている。配列表の配列番号1及び2に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

該挿入配列上の構造遺伝子の存在について、遺伝子検索プログラムGRAIL(ApoCom GRAIL Toolkit: APOCOM社製)及び相同性検索プログラムBLAST(Gapped-BLAST(BLAST2): WISCONSIN GCG package ver. 10.0に搭載)を用いて解析した。

その結果、pML48の挿入塩基配列中には、6種類の異なる構造遺伝子の存在が推定され、それぞれをmlcA、mlcB、mlcC、mlcD、mlcE及びmlcRと命名した。また、mlcA、mlcB、mlcE及びmlcRは

配列表の配列番号 2 記載の塩基配列中に、 m 1 c C 及び m 1 c D は配列表の配列番号 1 に示される塩基配列中に、それぞれコード領域を有していることが推定された。さらに、該挿入配列における各推定構造遺伝子の相対的位置及び大きさが推定された。

本実施例の結果を図 2 に記載した。

実施例 8、組換えDNAベクター pML48 の挿入配列の解析（2）

ノーザンプロット・ハイブリダイゼーション法及び R A C E により、実施例 7 において存在が示唆された構造遺伝子の発現解析、及び 5' - 末端並びに 3' - 末端領域の解析を行なった。

1) ペニシリウム・シリナム SANK 13380 の全 RNA の調製

ペニシリウム・シリナム SANK 13380 株を培養したスラント（実施例 2 記載）より 5 mm 角の菌体を 10 ml の MGB 3-8 培地を入れた 100 ml 容の三角フラスコに接種し、26°C にて 3 日間、振盪培養した。

培養物からの全 RNA の調製は、グアニジン・イソチオシアネート法を利用した RNeasy Plant Mini Kit (キヤゲン社製) を用いて行った。すなわち、培養物を、室温、5000 × G の条件下で 10 分間遠心分離して菌体を回収し、湿重量 2 g の菌体を液体窒素により凍結した後、乳鉢上で粉末になるまで破碎した。この破碎物をグアニジン・イソチオシアネートを含む 4 ml の菌体溶解バッファー（このキットに含まれる。）に懸濁した。懸濁液をこのキットに含まれる QIAshredder スピンカラム 10 本に 450 μl ずつ分注し、室温、1000 × G、10 分間遠心分離した後、溶出液をそれぞれ回収した。各溶出液に 225 μl ずつのエタノールを加えた後、このキットに含まれる RNA ミニスピンドルカラムに添加した。このカラムをこのキットに含まれる洗浄用緩衝液で洗浄した後、50 μl ずつのリボヌクレアーゼ・フリー蒸留水で吸着物を溶出させ、溶出液を全 RNA 画分とした。

2) ノーザンプロット・ハイブリダイゼーション

20 μg のペニシリウム・シリナム SANK 13380 の全 RNA を含む

2. 25 μl の水溶液に、1 μl の 10 × MOPS (組成；200 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸、50 mM 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA・2Na、pH 7.0 : 121°Cにて20分間オートクレーブ滅菌してから使用した。：同仁化学研究所（株）製)、1.75 μl のホルムアルデヒド及び5 μl のホルムアミドを添加して混合し、RNAサンプルとした。このRNAサンプルを、65°Cにて10分間保温した後、氷水中で急冷し、アガロースゲル電気泳動に供した。電気泳動のゲルは、10 ml の 10 × MOPS 及び 1 g の Agarose L03 「TAKARA」（宝酒造（株）製）を 72 ml のピロカルボニック・アシッド・ジエチルエステル (Sigma 社製) 処理水に混合し、加熱してアガロースを溶解させた後冷却させ、1.8 ml のホルムアルデヒドを添加することにより作製した。サンプルバッファーは、1 × MOPS (10 × MOPS を水で 10 倍希釈したもの。) を使用した。ゲル中の RNA を、10 × SSC 中で Hybond™-N+ (アマシャム社) ヘトランスファーした。

プローブには、pML48挿入配列を下記表1記載の制限酵素1及び2で消化することにより得られるDNA断片(a、b、c、d及びe)を用いた。

表1. ノーザンプロット・ハイブリダイゼーションのプローブ

| プローブ | 制限酵素 | 制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号* | 制限酵素 | 制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号* |
|------|---------|------------------------|-------|------------------------|
| a | EcoRI | 6319～6324 | EcoRI | 15799～15804 |
| b | BamHI | 16793～16798 | PstI | 18164～18169 |
| c | KpnI | 26025～26030 | BamHI | 27413～27418 |
| d | SalI | 28691～28696 | SalI | 29551～29556 |
| e | HindIII | 33050～33055 | SacI | 34039～34044 |

*各ヌクレオチド番号は、配列表の配列番号1に基く。

プローブの標識、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、実施例5のサザンプロット・ハイブリダイゼーションに従って行なった。

本実施例の結果を図3に記載した。

各シグナルは各プローブの塩基配列と相同な転写産物の存在を示す。

本実施例でpML48挿入配列上に存在が推定された6つの構造遺伝子のうち、mlcB、mlcD、mlcE及びmlcRはペニシリウム・シリナムSA NK13380株内で転写されていることが確認され、mlcA及びmlcCについても該細胞内で転写されていることが示唆された。

各シグナルの位置は、転写産物の相対的なサイズを示すものではない。

3) 5' RACEによる5' -末端配列の決定

各構造遺伝子の5' -末端領域を含むcDNAの取得は、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO社製) を用いて行なった。

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり且つ該遺伝子の5' -末端近傍に位置すると考えられる塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNAを2種類作製した。

表2に、各構造遺伝子の、より3' -側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA(1)の塩基配列を、表3に、より5' -側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA(2)の塩基配列を、それぞれ記載した。

表2. 5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴDNA(1)

| 遺伝子 | 配列表の配列番号 : 塩基配列 |
|------|-------------------------------|
| mlcA | 配列番号 5 : gcatgttcaatttgcttc |
| mlcB | 配列番号 6 : ctggatcagactttctgc |
| mlcC | 配列番号 7 : gtcgcagtagcatgggcc |
| mlcD | 配列番号 8 : gtcagagtatgctttctc |
| mlcE | 配列番号 9 : gttgagaggattgtgagggc |
| mlcR | 配列番号 10 : ttgcttgttggattgtc |

表3. 5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴDNA (2)

| 遺伝子 | 配列表の配列番号：塩基配列 |
|------|----------------------------------|
| m1cA | 配列番号1 1 : catggtaactctcgccgttc |
| m1cB | 配列番号1 2 : ctccccagtagtacgtaagctc |
| m1cC | 配列番号1 3 : ccataatgagtgtgactgttc |
| m1cD | 配列番号1 4 : gaacatctgcattccccgtc |
| m1cE | 配列番号1 5 : ggaaggcaaagaaagtgtac |
| m1cR | 配列番号1 6 : agattcattgctgttggcattc |

オリゴDNA (1) をプライマーとし、ペニシリウム・シリナム SANK 13380 株の全RNAを錆型とした逆転写反応により cDNA 第一鎖を合成した。すなわち、1 μg の全RNA、2. 5 pmol のオリゴDNA (1) 、1 μl の SUPER SCRIPPTM II reverse transcriptase (このキットに含まれる。) を含む 24 μl の反応液を、16°Cにて 1 時間保温した後、生成物をこのキットに含まれる GLASSMAX スピンカートリッジに添加して cDNA 第一鎖を精製した。

cDNA 第一鎖の 3' - 末端に、このキットに含まれる terminal deoxyribonucleotidyl transferase によりポリ C 鎖を付加させた。

3' - 末端にポリ C 鎖の付加した cDNA 第一鎖、40 pmol のオリゴDNA (2) 及び 40 pmol の Abriged Anchor Primer (このキットに含まれる) を含む 50 μl の反応液を、94°Cにて 2 分間保温し、続いて、94°Cにて 30 秒、55°Cにて 30 秒、及び、72°Cにて 2 分間を 1 サイクルとする反応を 35 回行なった後、72°Cにて 5 分間、4°Cにて 1.8 時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルから DNA を回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例 4 記載の方法に準じて PCR 2. 1 を用いてクローニングした。

以上の操作を 5' RACE という。

5' - 末端を含む cDNA 断片の塩基配列を決定し、転写開始点及び翻訳開始コドンの位置を推定した。

5' RACE により得られた各構造遺伝子に対応する 5' - 末端 cDNA 断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表 4 に表示した。また、表 5 に、各構造遺伝子の転写開始点及び翻訳開始の存在する配列番号、転写開始点の位置及び翻訳開始点の位置を記載した。

表 4. 各 5' - 末端 cDNA 断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

| 遺伝子 | 配列表の配列番号 |
|------|----------|
| m1cA | 配列番号 1 7 |
| m1cB | 配列番号 1 8 |
| m1cC | 配列番号 1 9 |
| m1cD | 配列番号 2 0 |
| m1cE | 配列番号 2 1 |
| m1cR | 配列番号 2 2 |

表 5. 各遺伝子の転写開始点及び翻訳開始コドンの位置

| 遺伝子 | 翻訳開始コドンの 存在する配列番号 * | 配列番号 1 又は 2 におけるヌクレオチド 番号 | 転写開始点 | 翻訳開始コドン |
|------|------------------------|------------------------------|-----------------------|---------|
| m1cA | 配列番号 2 | 2 2 9 1 3 | 2 3 0 4 5 ~ 2 3 0 4 7 | |
| m1cB | 配列番号 2 | 1 1 6 8 9 | 1 1 7 4 8 ~ 1 1 7 5 0 | |
| m1cC | 配列番号 1 | 1 1 6 4 1 | 1 1 7 9 6 ~ 1 1 7 9 8 | |
| m1cD | 配列番号 1 | 2 4 0 6 6 | 2 4 3 2 1 ~ 2 4 3 2 3 | |
| m1cE | 配列番号 2 | 3 3 9 9 | 3 5 4 5 ~ 3 5 4 7 | |
| m1cR | 配列番号 2 | 3 6 5 | 4 0 0 ~ 4 0 2 | |

* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的であ

る。

4.) 3' RACEによる3' - 末端配列の決定

各構造遺伝子の3' - 末端領域を含むcDNAの取得は、Ready To Go : T-Primed First-Strand kit (ファルマシア社製) を用いて行なった。

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入塩基配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり、構造遺伝子の3' - 末端近傍に位置すると考えられるセンス側のオリゴDNA(3)を1種類ずつを作製した。

表6に各構造遺伝子について作製したオリゴDNA(3)の塩基配列を表示した。

表6. 3' RACEによる3' - 末端配列解析に用いるオリゴDNA(3)

| 遺伝子 | 配列表の配列番号：塩基配列 |
|------|---------------------------------|
| m1cA | 配列番号23 : atcataccatcttcaacaac |
| m1cB | 配列番号24 : gctagaataggttacaaggcc |
| m1cC | 配列番号25 : acattgccaggcaccaggac |
| m1cD | 配列番号26 : caacgccccaaagctgccaatc |
| m1cE | 配列番号27 : gtctttcctactatctacc |
| m1cR | 配列番号28 : ctttccccagctgtactatc |

オリゴDNA(3)をプライマーとし、ペニシリウム・シリナム SANK 13380株の全RNA(1μg)を錆型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。

cDNA第一鎖、40pmolのオリゴDNA(3)及びNotI-d(T)18プライマー(このキットに含まれる。)を含む100μlの反応液を、94°Cにて2分間保温し、続いて、94°Cにて30秒、55°Cにて30秒、及び、72°Cにて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72°Cにて5分

間、4°Cにて18時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてpCR2.1を用いてクローニングした。

以上の操作を3' RACEという。

得られたcDNAの3'一側断片の塩基配列を決定し、翻訳終止コドンの位置を推定した。

3' RACEにより得られた各構造遺伝子に対応する3'一末端cDNA断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表7にまとめた。また、表8に、各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該コドンの位置を配列表の配列番号1又は2に基いて記載した。

表7. 各3'一末端cDNA断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

| 遺伝子 | 配列表の配列番号 |
|------|----------|
| mlcA | 配列番号29 |
| mlcB | 配列番号30 |
| mlcC | 配列番号31 |
| mlcD | 配列番号32 |
| mlcE | 配列番号33 |
| mlcR | 配列番号34 |

表8. 各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該翻訳終止コドンの位置

| 遺伝子 | 翻訳終止 コドン | 翻訳終止コドンの 存在する配列番号* | 配列番号1又は2における 翻訳終止コドンのヌクレオ チド番号 |
|------|-------------|-----------------------|--------------------------------------|
| mlcA | tag | 配列番号2 | 3 2 7 2 3 ~ 3 2 7 2 5 |
| mlcB | taa | 配列番号2 | 1 9 8 4 0 ~ 1 9 8 4 2 |
| mlcC | taa | 配列番号1 | 1 3 4 7 9 ~ 1 3 4 8 1 |

| | | | |
|-------------|-----|--------|-----------------------|
| <u>m1cD</u> | tga | 配列番号 1 | 2 7 8 9 0 ~ 2 7 8 9 2 |
| <u>m1cE</u> | tga | 配列番号 2 | 5 7 3 0 ~ 5 7 3 2 |
| <u>m1cR</u> | tag | 配列番号 2 | 1 9 1 5 ~ 1 9 1 7 |

*配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

さらに、各構造遺伝子がコードすると推定されるポリペプチドの C 末端のアミノ酸残基、そのアミノ酸残基をコードするトリヌクレオチドの塩基配列及びそのトリヌクレオチドの位置を表 9 に記載した。

表 9. 各構造遺伝子のコードするポリペプチドの C 末端アミノ酸

| 遺傳子 | C 末端アミノ酸残基 | 該アミノ酸をコードするトリヌクレオチドの塩基配列 | 該トリヌクレオチドの存在する配列番号* | 配列番号 1 又は 2 における該トリヌクレオチドのヌクレオチド番号 |
|-------------|------------|--------------------------|---------------------|------------------------------------|
| <u>m1cA</u> | アラニン | gcc | 配列番号 2 | 32720 ~ 32722 |
| <u>m1cB</u> | セリン | agt | 配列番号 2 | 19837 ~ 19839 |
| <u>m1cC</u> | システィン | tgc | 配列番号 1 | 13476 ~ 13478 |
| <u>m1cD</u> | アルギニン | cgc | 配列番号 1 | 27887 ~ 27889 |
| <u>m1cE</u> | アラニン | gct | 配列番号 2 | 5727 ~ 5729 |
| <u>m1cR</u> | アラニン | gct | 配列番号 2 | 1912 ~ 1914 |

*配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

また、表 8 記載の翻訳終止コドンに対する相補配列、該相補配列の存在する配列番号、及び、該相補配列の位置を表 10 にまとめた。

表 10. 各構造遺伝子の翻訳終始コドンに対する相補配列

| 遺伝子 | 翻訳終始コドン | 該相補配列の存在 | 配列番号 1 又は 2 における該相補配列の位置 |
|-----|---------|----------|--------------------------|
|-----|---------|----------|--------------------------|

| 列 | に対する相補配する配列番号* | る該相補配列のヌクレオチド番号 |
|------|----------------|------------------------------|
| m1cA | cta | 配列番号 1 1 4 7 9 ~ 1 4 8 1 |
| m1cB | tta | 配列番号 1 1 4 3 6 2 ~ 1 4 3 6 4 |
| m1cC | tta | 配列番号 2 2 0 7 2 3 ~ 2 0 7 2 5 |
| m1cD | tca | 配列番号 2 6 3 1 2 ~ 6 3 1 4 |
| m1cE | tca | 配列番号 1 2 8 4 7 2 ~ 2 8 4 7 4 |
| m1cR | cta | 配列番号 1 3 2 2 8 7 ~ 3 2 2 8 9 |

*配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

以上の通り、各構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。これらの情報に基いて、各構造遺伝子の転写産物及び翻訳産物を取得することが可能である。

実施例 9. 組換えDNAベクター pML48 を用いたペニシリウム・シリナムの形質転換

ペニシリウム・シリナムの形質転換は、ナラらの方法 (Nara, F., et al., Curr. Genet. 23, 28 (1993) 記載) に従った。

1) プロトプラストの調製

ペニシリウム・シリナム SANK 13380 株を培養したスラントより、白金耳を用いて P G A 寒天培地に接種し、26℃にて 14 日間保温した。該培養物よりペニシリウム・シリナム SANK 13380 株の胞子を回収し、1 × 10⁸ 個の胞子を 80 ml の Y P L - 20 培地に接種し、26℃にて 1 日間保温した。胞子の発芽を顕微鏡観察により確認した後、発芽胞子を、室温、5000 × G の条件下で 10 分間遠心分離して胞子を沈澱として回収した。胞子を滅菌水で 3 回洗浄した後、プロトプラスト化を行なった。すなわち、200 mg のザイモリアーゼ 20 T (生化学工業 (株) 製) 及び 100 mg のキチナーゼ (S i g

ma 社製) を 10 ml の 0.55M 塩化マグネシウムに溶解し、室温、5000 × G の条件下で 10 分間遠心分離して得られた上清を酵素液とし、20 ml の酵素液及び湿重量 0.5 g の発芽胞子を 100 ml 容三角フラスコに入れ、30 °C にて 60 分間穏やかに振盪し、発芽胞子がプロトプラスト化したことを顕微鏡観察により確認した後、反応液を 3G - 2 ガラスフィルター (HARIO 社製) で濾過した。該濾液を、室温、1000 × G の条件下で 10 分間遠心分離し、プロトプラストを沈澱として回収した。

2) 形質転換

1) で得られたプロトプラストを 30 ml の 0.55M 塩化マグネシウム溶液で 2 回、30 ml の 0.55M 塩化マグネシウム - 50 mM 塩化カルシウム - 10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸 (pH 6.3 : 以下、「MCM 溶液」という。) で 1 回それぞれ洗浄し、100 μl の 4% (w/v) ポリエチレングリコール 8000 - 10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸 - 0.0025% (w/v) ヘパリン (Sigma 社製) - 50 mM 塩化マグネシウム (pH 6.3 : 以下、「形質転換用溶液」という。) に懸濁した。約 5×10^7 個のプロトプラストを含む 96 μl の形質転換溶液及び 120 μg の pML48 DNA を含む 10 μl の TE を混合し、氷上で 30 分間静置した。これに 1.2 ml の 20% (w/v) ポリエチレングリコール - 50 mM 塩化マグネシウム - 10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸 (pH 6.3) を加えて穏やかにピペッティングし、室温、20 分間静置した。これに 10 ml の MCM 溶液を加えて穏やかに混合し、室温、1000 × G の条件下で 10 分間遠心分離した。沈澱より形質転換プロトプラストを回収した。

3) 形質転換プロトプラストにおける細胞壁の再生

2) で得られた形質転換プロトプラストを 5 ml の液状の VGS 中層寒天培地に懸濁し、固化した 10 ml の VGS 下層寒天培地プレートに重層した。該プレートを、26 °C にて 1 日間培養した後、プレート 1 枚につき 5 mg のハイグロマイシン B (Hygromycin B : Sigma 社製) を含む 10 ml の液状の VGS 上層寒天培地を重層した (ハイグロマイシン B の終濃度は 200 μg /

m l)。26°Cにて14日間保温して得られた菌株を、200 μg/m lのハイグロマイシンBを含有するPGA寒天培地上で継代培養した後、PGA寒天培地で作製したスラントに植え継ぎ、26°Cにて14日間保温した。

これを形質転換株という。

該スラントは4°Cで保存した。

試験例1. 形質転換株及び親株の有するML-236B生産能の比較

実施例9において得られた形質転換株及び親株ペニシリウム・シリナム SANK 13380株を培養し、該培養物中のML-236B量を測定した。

形質転換株を培養したスラント（実施例9記載）又はペニシリウム・シリナム SANK 13380株を培養したスラント（実施例2記載）より5mm角の菌体を、10m lのMBG 3-8培地を入れた100m l容の三角フラスコに接種し、26°Cにて2日間、振盪培養した後、3.5m lの50%（w/v）グリセリン溶液を添加し、さらに26°Cにて10日間、振盪培養した。

該培養物10m lに50m lの0.2規定水酸化ナトリウムを加え、26°Cにて1時間、振盪しつつ保温した後、室温、3000×Gの条件下で2分間遠心分離し、1m lの上清を回収し、9m lの50%メタノールと混合してHPLCに供した。

HPLCのカラムには、SSC-ODS-262（直徑6mm、長さ100m m：センシュー科学（株）製）を用い、移動相には75%（v/v）メタノール-0.1%（v/v）トリエチルアミン-0.1%（v/v）酢酸を用い、室温にて2m l/分の流速で溶出した。これら条件下において、ML-236Bはカラム添加後4.0分に溶出された。検出はUV検出器の吸収波長を236nmに設定して行なった。

形質転換株のうちML-236B生産能の改善された株が5つ得られ、これらの生産能は親株より平均12%高かった。

この5株のML-236B生産能は、モノスポア処理等の継代を行なった後も安定に維持された。

「産業上の利用の可能性」

本発明においてML-236B生産菌より得られたDNAは、該生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生産能を改善する。

また、該DNA上に6つの構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。本発明により、それぞれの構造遺伝子に対応するcDNAを取得することが可能になる。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203で示される塩基配列を含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
2. 形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) より得ることができる、請求項1記載のDNA。
3. 請求項1又は2記載のDNAとハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
4. 請求項1又は2記載のDNAとストリン杰ントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
5. 請求項1乃至4のいずれか一つに記載のDNAを含む組換えDNAベクター。
6. 形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) に保持される、請求項5記載の組換えDNAベクター。
7. 請求項5又は6記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。
8. ML-236B生産菌であることを特徴とする請求項7記載の宿主細胞。
9. ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、請求項8記載の宿主細胞。
10. 請求項8又は9記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法。
11. 大腸菌であることを特徴とする、請求項7記載の宿主細胞。
12. 形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199 (FERM BP-6780) である、請求項11記載の宿主細胞。
13. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号23045のアデニン又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーA1。

1 4. 請求項 1 3 記載の P C R 用プライマー A 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー A 2

(但し、該 P C R 用プライマー A 2 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 2 3 0 4 5 乃至 2 3 0 4 7 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を增幅させるための P C R に用いられ得る)

。

1 5. 請求項 1 3 記載の P C R 用プライマー A 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー A 3

(但し、該 P C R 用プライマー A 3 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 2 3 0 4 5 乃至 2 3 0 4 7 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を增幅させるための P C R に用いられ得る)

。

1 6. 請求項 1 3 記載の P C R 用プライマー A 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー A 4

(但し、該 P C R 用プライマー A 4 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 2 3 0 4 5 乃至 2 3 0 4 7 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を增幅させるための P C R に用いられ得る)

。

1 7. 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 1 4 7 9 のシトシン又はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を有する P C R 用プライマー B 1 。

1 8. 請求項 1 7 記載の P C R 用プライマー B 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有する、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー B 2

(但し、該 P C R 用プライマー B 2 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3 2 7 2 0 乃至 3 2 7 2 2 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を增幅させるための P C R に用いられ得る) 。

1 9. 請求項 1 7 記載の P C R 用プライマー B 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同

性を有する、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー B

3

(但し、該 PCR 用プライマー B 3 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 32720 乃至 32722 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)。

20. 請求項 17 記載の PCR 用プライマー B 1 の塩基配列と 90% 以上の相同

性を有する、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー B

4

(但し、該 PCR 用プライマー B 4 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 32720 乃至 32722 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)。

21. 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 11748 のアデニン又

はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を有する PCR 用プライマー C 1。

22. 請求項 21 記載の PCR 用プライマー C 1 の塩基配列と 70% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー C 2

(但し、該 PCR 用プライマー C 2 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 11748 乃至 11750 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)

。

23. 請求項 21 記載の PCR 用プライマー C 1 の塩基配列と 80% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー C 3

(但し、該 PCR 用プライマー C 3 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 11748 乃至 11750 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)

。

24. 請求項 21 記載の PCR 用プライマー C 1 の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー C 4

(但し、該PCR用プライマーC4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

25. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号14362のチミン又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーD1。

26. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD2

(但し、該PCR用プライマーD2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

27. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD3

(但し、該PCR用プライマーD3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

28. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD4

(但し、該PCR用プライマーD4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

29. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号11796のアデニン又はそれより5'一側の塩基を5'一末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーE1。

30. 請求項29記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE2

(但し、該PCR用プライマーE2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番

号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基をN末端とする
ポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

。 3 1 . 請求項 2 9 記載の PCR 用プライマー E 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相
同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー E 3
(但し、該 PCR 用プライマー E 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番
号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基をN末端とする
ポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

。 3 2 . 請求項 2 9 記載の PCR 用プライマー E 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相
同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー E 4
(但し、該 PCR 用プライマー E 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番
号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基をN末端とする
ポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

。 3 3 . 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 2 0 7 2 3 のチミン又は
それより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる
配列を有する PCR 用プライマー F 1 。

3 4 . 請求項 3 3 記載の PCR 用プライマー F 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相
同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー F 2
(但し、該 PCR 用プライマー F 2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番
号 1 3 4 7 6 乃至 1 3 4 7 8 によりコードされるシステイン残基をC末端とする
ポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

。 3 5 . 請求項 3 3 記載の PCR 用プライマー F 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相
同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー F 3
(但し、該 PCR 用プライマー F 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番
号 1 3 4 7 6 乃至 1 3 4 7 8 によりコードされるシステイン残基をC末端とする

ポリペプチドをコードする c DNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

3 6. 請求項 3 3 記載の PCR 用プライマー F 1 の塩基配列と 90 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー F 4

(但し、該 PCR 用プライマー F 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 3 4 7 6 乃至 1 3 4 7 8 によりコードされるシステイン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)

3 7. 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 のアデニン又はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を有する PCR 用プライマー G 1。

3 8. 請求項 3 7 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 70 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 2

(但し、該 PCR 用プライマー G 2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

3 9. 請求項 3 7 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 80 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 3

(但し、該 PCR 用プライマー G 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

4 0. 請求項 3 7 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 90 % 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 4

(但し、該 PCR 用プライマー G 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c DNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

4 1. 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 6 3 1 2 のチミン又はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配

列を含むPCR用プライマーH1。

4.2. 請求項4.1記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と70%以上の相同意を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH2

(但し、該PCR用プライマーH2は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

4.3. 請求項4.1記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と80%以上の相同意を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH3

(但し、該PCR用プライマーH3は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

4.4. 請求項4.1記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と90%以上の相同意を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH4

(但し、該PCR用プライマーH4は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

4.5. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号3545のアデニン又はそれより5'ー側の塩基を5'ー末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI1。

4.6. 請求項4.5記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と70%以上の相同意を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI2

(但し、該PCR用プライマーI2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

4.7. 請求項4.5記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と80%以上の相同意を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI3

(但し、該PCR用プライマーI3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプ

チドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

4 8. 請求項4 5記載のPCR用プライマーI 1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI 4
(但し、該PCR用プライマーI 4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

4 9. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号28472のチミン又はそれより5'ー側の塩基を5'ー末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ 1。

5 0. 請求項4 9記載のPCR用プライマーJ 1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ 2
(但し、該PCR用プライマーJ 2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

5 1. 請求項4 9記載のPCR用プライマーJ 1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ 3
(但し、該PCR用プライマーJ 3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

5 2. 請求項4 9記載のPCR用プライマーJ 1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ 4
(但し、該PCR用プライマーJ 4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

5 3. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号400のアデニン又はそれより5'ー側の塩基を5'ー末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK 1。

5 4. 請求項5 3記載のPCR用プライマーK 1の塩基配列と70%以上の相同

性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー K 2
(但し、該 PCR 用プライマー K 2 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番
号 400 乃至 402 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプ
チドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)。

55. 請求項 53 記載の PCR 用プライマー K 1 の塩基配列と 80% 以上の相同
性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー K 3

(但し、該 PCR 用プライマー K 3 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番
号 400 乃至 402 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプ
チドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)。

56. 請求項 53 記載の PCR 用プライマー K 1 の塩基配列と 90% 以上の相同
性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー K 4

(但し、該 PCR 用プライマー K 4 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番
号 400 乃至 402 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプ
チドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)。

57. 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 32287 のシトシン又
はそれより 5' 一側の塩基を 5' 一末端とする、少なくとも 10 個の塩基からな
る配列を含む PCR 用プライマー L 1。

58. 請求項 57 記載の PCR 用プライマー L 1 の塩基配列と 70% 以上の相同
性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー L 2

(但し、該 PCR 用プライマー L 2 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番
号 1912 乃至 1914 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペ
チドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)。

59. 請求項 57 記載の PCR 用プライマー L 1 の塩基配列と 80% 以上の相同
性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー L 3

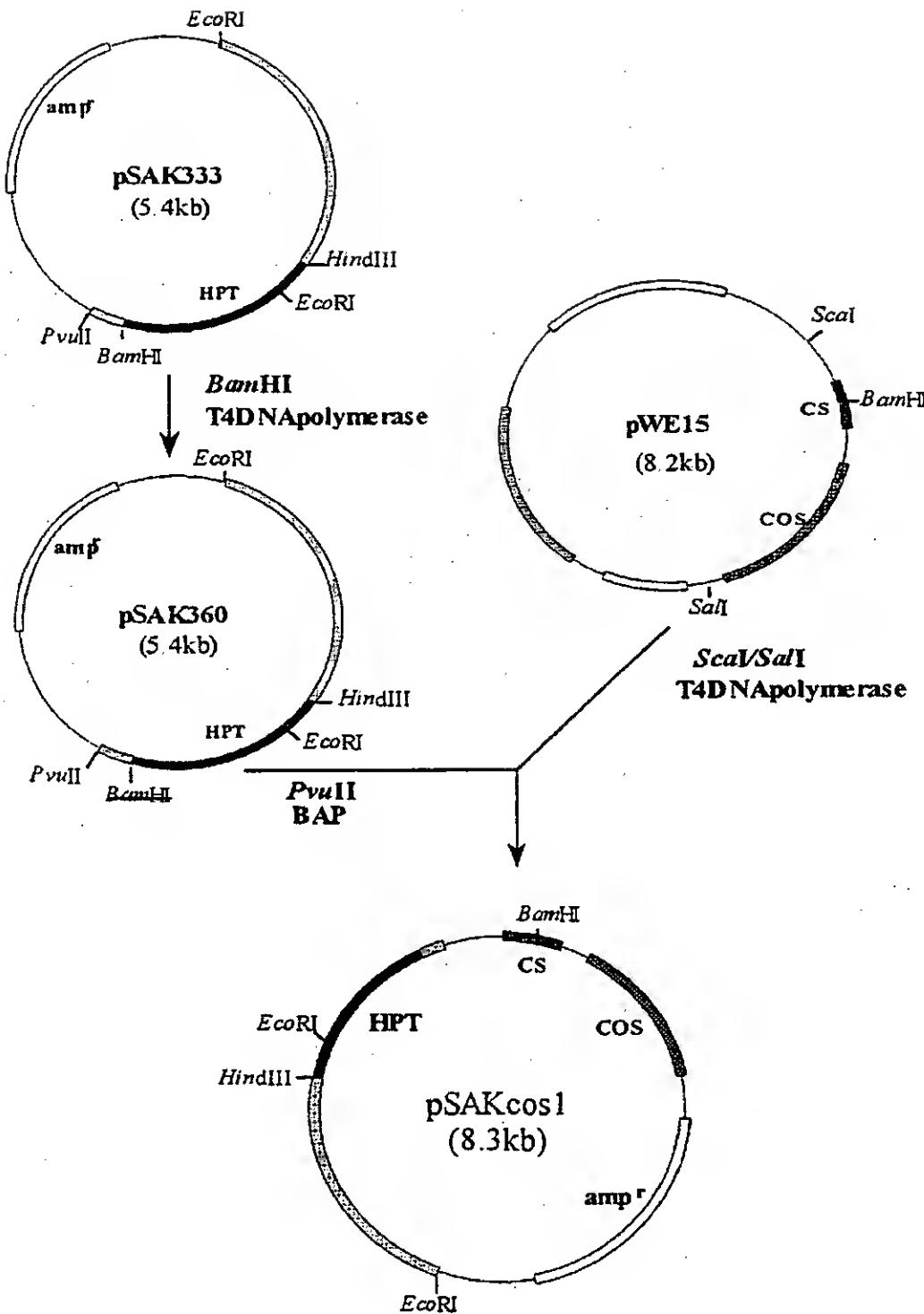
(但し、該 PCR 用プライマー L 3 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番
号 1912 乃至 1914 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペ
チドをコードする cDNA を增幅させるための PCR に用いられ得る)。

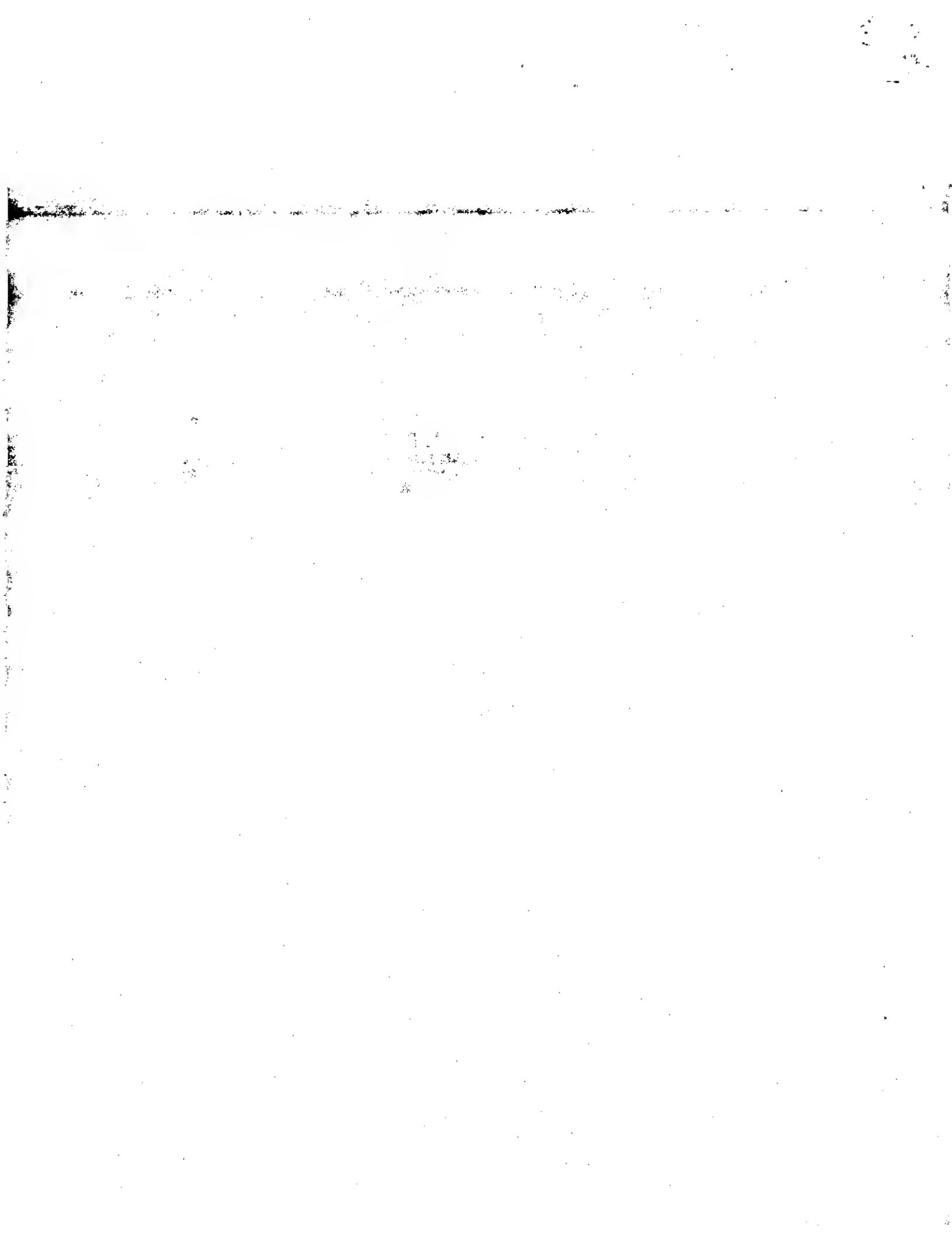
60. 請求項 57 記載の PCR 用プライマー L 1 の塩基配列と 90% 以上の相同

性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー L 4
(但し、該 P C R 用プライマー L 4 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番
号 1 9 1 2 乃至 1 9 1 4 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペ
プチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)。

1/3

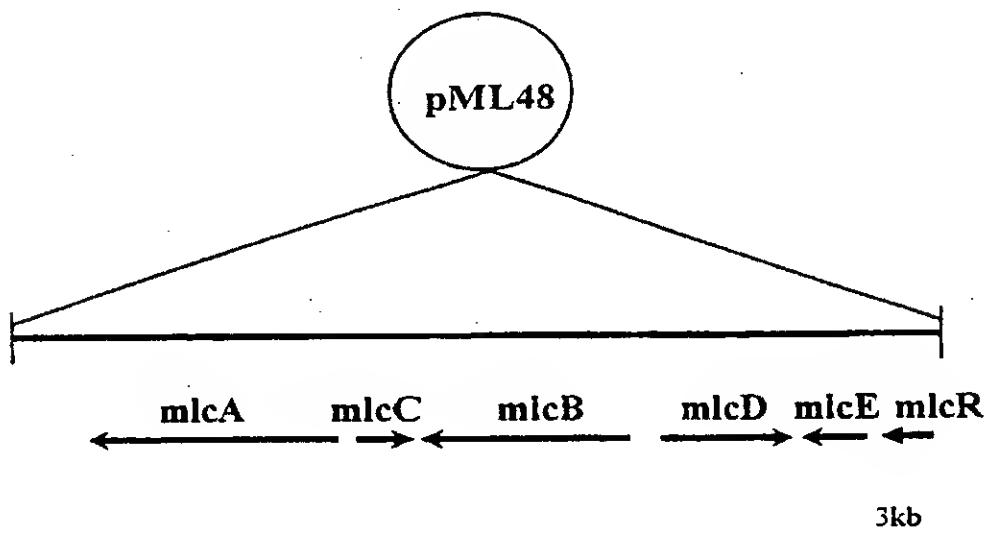
【図1】

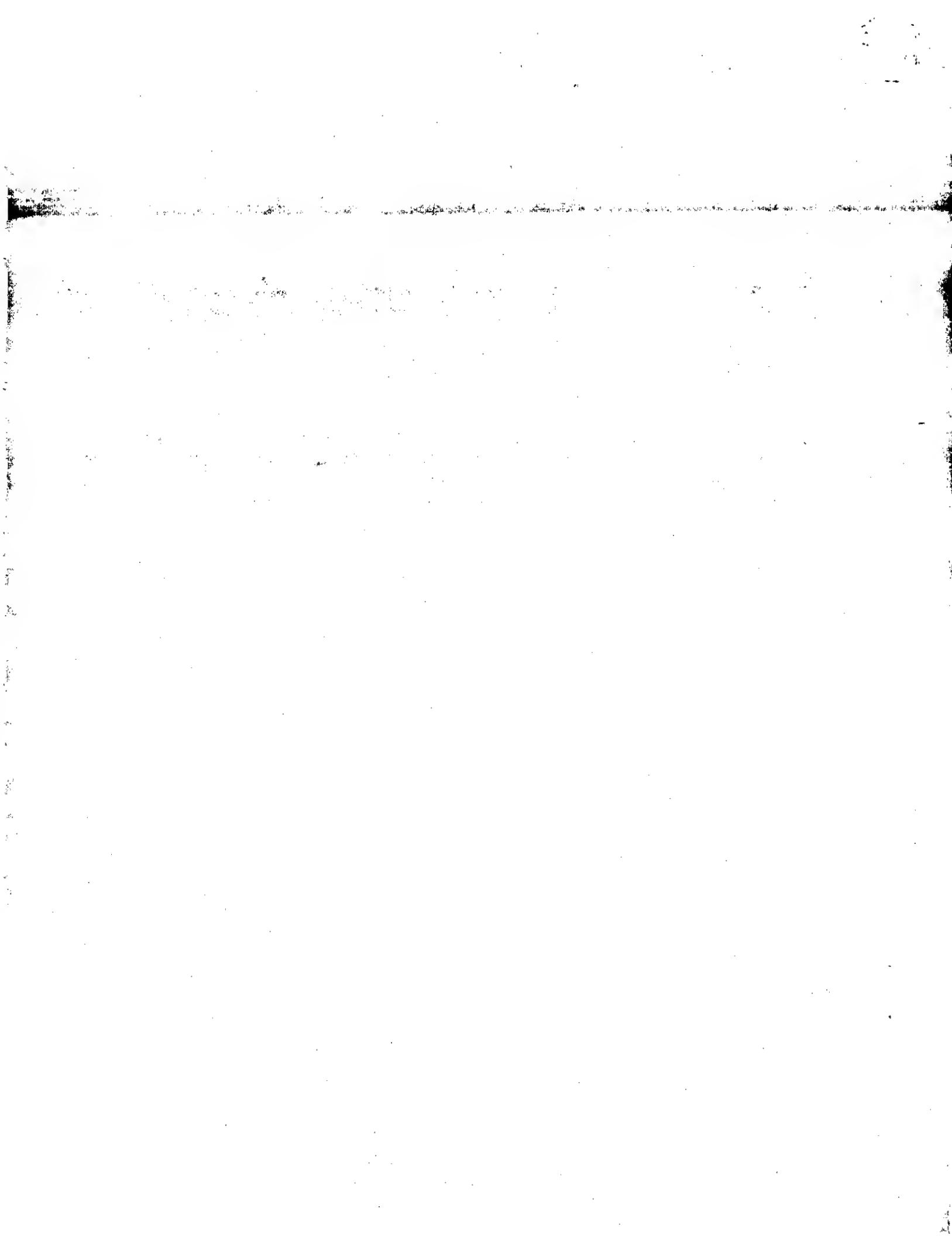




【図2】

pML48挿入配列上の推定構造遺伝子(mlcA,mlcB,MlcC,mlcD,mlcE,mlcR)の位置、大きさ及び方向

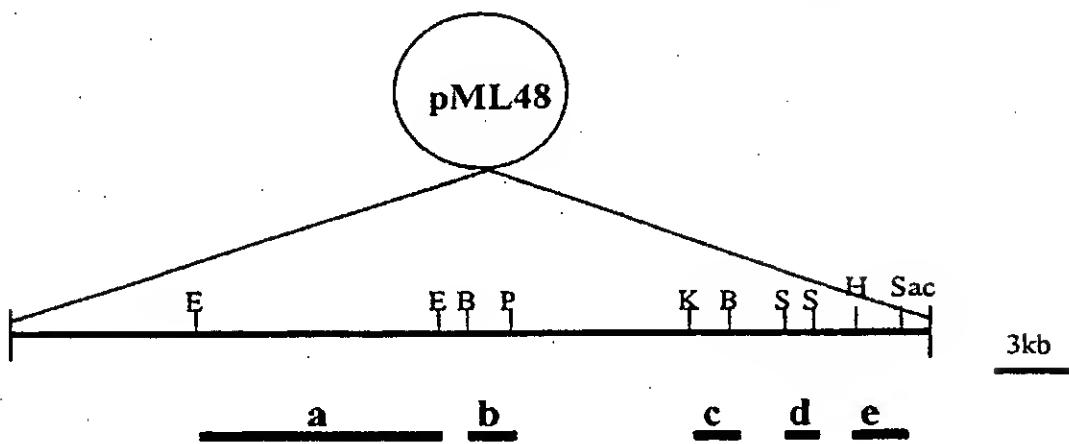




3/3

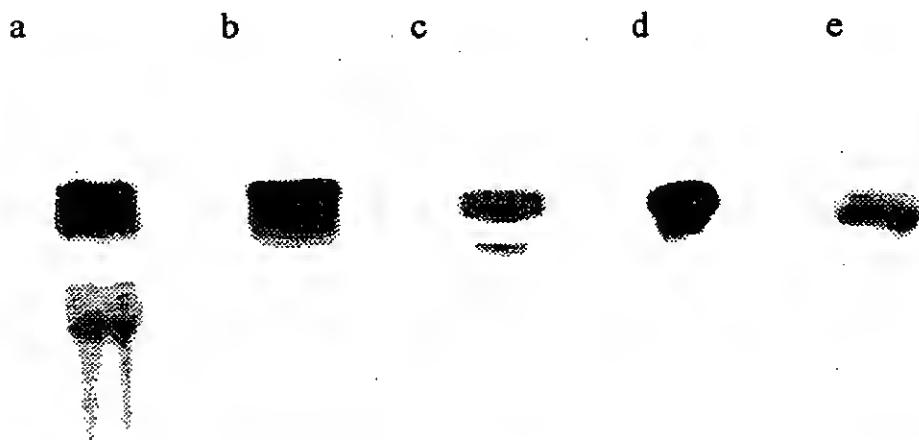
【図3】

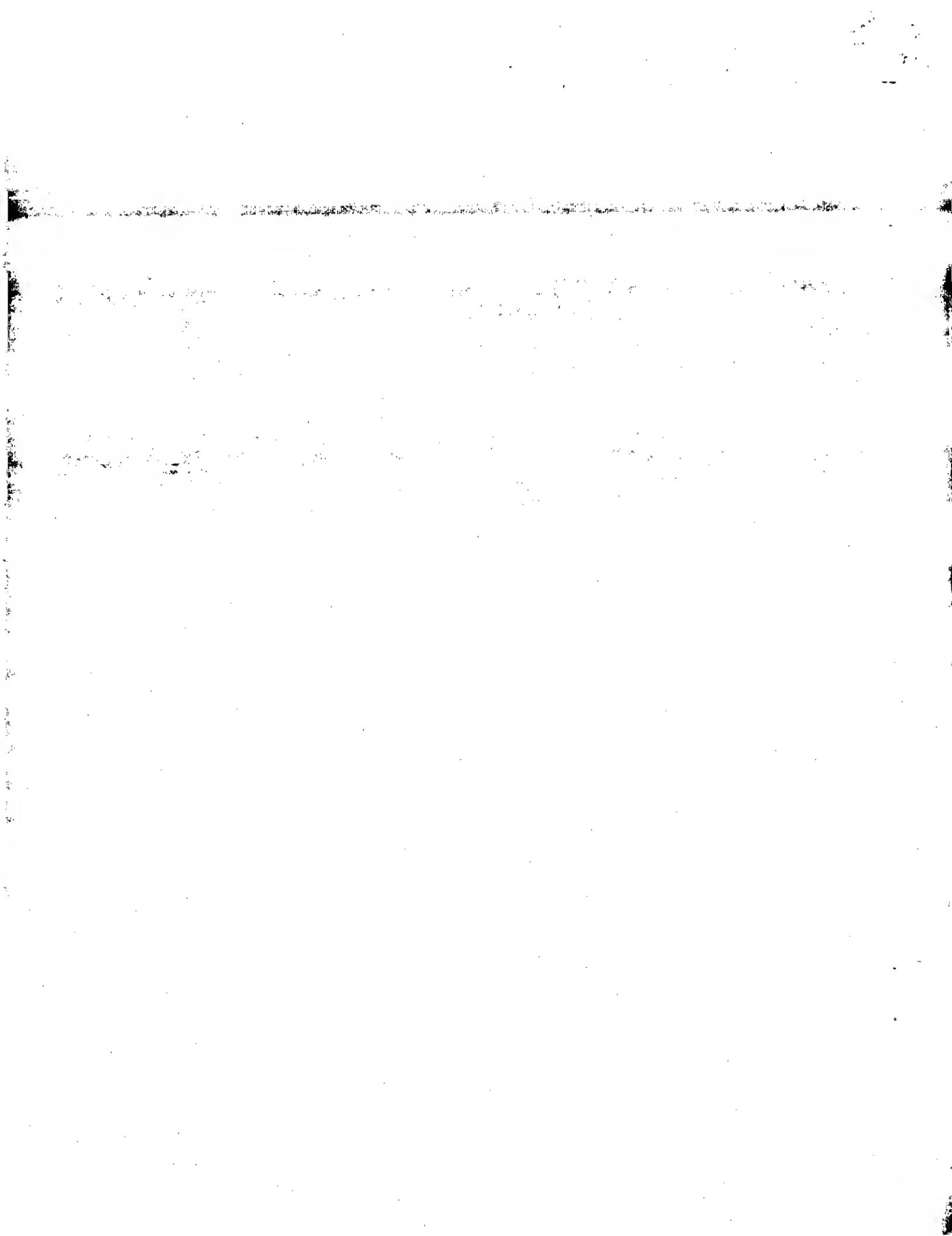
A ノーザンプロット・ハイブリダイゼーションに使用したプローフ (a,b,c,d,e) の位置



E; EcoRI, B; BamHI, P; PstI, K; KpnI, S; SalI, H; HindIII, Sac; SacI

B ノーザンプロットハイブリダイゼーションの結果





SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> DNAs related the biosynthesis of ML-236B

<130> 2000103SW

<140>

<141>

<150> JP HEI 11-227696

<151> 1999-8-11

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34203

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 1

gatcaatact acgtcggtt tatttccttg tcagtaatga ctaacaaatt ccccaagaaca 60
gacgaagtca cagctcacac cacaagagaa aatgagtcga gcgaggattt cagatttctc 120
gccaggcaaa ccgagaaaaag ctctcttatg catccacggc gccgggtgct cagcagccat 180
attccgcgtc cagatctcta aactgcgcgt ggctttgaaa aacgagttt aattcgatata 240
tgcgaccgcg ccgttagct ccagccccgg accccggcgtg cttcctgtct tccaaggcat 300

gggtccatac tacacctgg tccaaaagca tcatgacgcc gttacaaca cgacaacccc 360
cacgggtgggc gatagagtag cggctgtat cggccctgtg caaaagaccg tccaagattt 420
gtctataact aacccacagg cacccattgt cggcatatgt gccttctctg agggcgatt 480
ggtcgcccact ttgctgctcc atcaacagca aatggaaaaa ctgccatgtt ttccgaaaat 540
gagcattgtt gtttgattt gctgtttcta tagcgatgaa gccagagatt acatgagagc 600
cgaggcgcaa gacgacgacg acaagctaat aatcaacgtt ccgacactgc atcttcacgg 660
tcgtcaagat tttgctctcc aagggtcgag acagatggtt gaaacacatt acctgcctca 720
gaatgcagat gtactcgagt ttcagggaaa gcataattt cccaacagac cgagtgtatgt 780
ccaggagacg gtcaagcgct tccaacagct atatcaaaa gtcaagatgt caggttcatt 840
tgtcttaggtt agacaacagg gtatatacgca aggctctggc tctcatgcct agtccatacc 900
acatttttac tgaacaaatt tgaatagttc taatcttaca cggtttaat gctcaccttc 960
caagggttat ttagttatag tggtcgcgac catctcataa atatttcgtt aacatatttt 1020
ggatagatca tggaggctc gttctgaaca ggcacgacag acatctaaaa ccactcgatc 1080
accacaacaa ggcactaaac cagtaactat ggaactattt gcaatggcgt cgaatttata 1140
tacaggatgg attgaaatca attccaaggcc ttggaggtt caccccttc acagagtctt 1200
tcgaaacgacg ctaccgaggt atatttatca ccgttacggt actctgaacc ggcgtatcta 1260
acttgatgtt acgattgctg caataaagaa gagcaacgaa ggtagaagta attttgacaa 1320
agatacaaga cgaattcgct attttagat gaatatgcgt gtgtcaattt acgcccattt 1380
caggatagat ttgccccatctg ctctattgcc aatttctaat ccatctttt catgaacaac 1440
actcaaaccac cacatctgaa ttcacggcgc tgaacgatct aggccaaactt cagagccggg 1500
ttcatcgaga acatagttag gattgaagaa aagtggctt caaaggcctg agcgtgctca 1560
ggccataca gcgagctctg aagtttgaca tgaatgagt ggtccttggt agggcatcc 1620
cacatctcga gaacgatgtc ataaggagtg cgctcacggg aagcgagaac actcgctt 1680
ttggcattgc caatttggcc actctccgct tgaccctgtc tgtaatcaaa gacaggctgg 1740
aacaaggggg cgtgtgtctg agtcttgggt tcctcgctg aggttagggag attcaggcct 1800
agacagtctg ggtatgacgac atacggcacc cgcgcgtt gcatggcctc acgcacactg 1860
tccttgggtt ctacaagggtt ctcggccat gtcttgctgc cgacgaactc atcaaagcgc 1920
aggggaagca cgttagcgaa aaagcccatc ggcggaaattt cttccatgtt ggatcggtt 1980
gtttcgccgaa ggccgatgtt tatgtctttt ctgcccgtt gacgcgcacaa caaaacgtgg 2040

taggcggcca ggtagaactg catggggtt gccttgcgt tgccgctccg ctcttgatt 2100
cggaaggcga ccatgggatc taaacgagca attgcttcat actgctgcc a cgtaatggc 2160
tgtatttgct gctgctctga attggcagca gggtcattga tcagaticat gatggaaagc 2220
acggttggcg cagatgacga gactttgcta tgcattggact tccagaacgc gatatcgcc 2280
cccattcgcc cattttccag gtttcccgc tttggacgg ctagatcaga gaattgggtc 2340
gatggtcgt gcatttcac cccgctgtaa atctgcccga tctcattgaa caggtttct 2400
gttggtagc catcaccaac taatctgtgg tagccgatta ccaacaggtg gtcattgtg 2460
ccccagtaga aatcaacgag tctgagagtg tcacctgtgg agatgctata gtttgttcc 2520
tcgagttcc ggtactcttc ctctgcctcc gcagcgttgt tcacctgaac aaagtgcact 2580
ctgttctccg gtttctttag aaccacttgg acgggaccat taaaatcgct gctatagtca 2640
tcgcccataa caaagcacgt acggaagatc tcgtgacggc gcaatgagggc tttcagagcc 2700
cgcctcaacc ggtcgaggc aatggtaccc ttcatgaaca tgccaatagt gttgttgaag 2760
atggtatgt cttttaccat ttgttgcgtc ctccaggaat actcctggcc aagggacaac 2820
ctctcgacgac gaagaatctt acggcctccc tgctcattat cgtcctcttg ctcttcattcc 2880
tcttcggctg acgacgcatc tgtgctggta gcagagcttgc ttcatcatg gctgtctgtt 2940
ggtgtcggag aagccccgct gtccgagggtt cccgtggaat caccaatttgc caacagcagc 3000
ggaatggatg tagctgggag tcgggtggcc gctgtcgcaagatcagc gacagaagca 3060
ccgccaagta ccctcaagag tgggaggtca aggttagagtt gctttgagaa ccatgagccg 3120
acagtcaactg caccaagga gtcgacaccc tcatcaatga gaggaatggt tgggtccacg 3180
ctctccccgt ccgaaacttg gaggtaaca cggagtttct cagatagacc atctgcaact 3240
ttgttagttt gaactcgata tcaggaaacg catgagagat aacttaccaa tcacgatttgc 3300
ccgaacttgg tctaaagttt ttgttgcgtt gagctggcgt gcaatggagc ctttagaccc 3360
tgatccatttgcgacccgt ctccgcgtt accggaaatt ttgaagtttgc gaaacgagg 3420
gtcggttgcag taaataatttgc gatcttgcag cgcagggtca agatctggga tacccgtgg 3480
aagctcaagg tccgcccattgt caatgaccgt cttgcgttgt ggttgctgcc gggcacgctg 3540
gtcagacacg accgcttcgg cgaaaagcgt gtgcagctca tgctttcaaa ctgagtc当地 3600
catgaaacgg atagcatcaa agtccctc catctggcc ctcgtgacaa accctacacc 3660
gtaaacggca ccaatatcga tgggtgatcc ctgtgggtgt gcgttagtaa ctgtacgtcg 3720
atgcatacatgata attcagggtt agaaaatacc gccaatccctc tggcgcaccg ttgctggcc 3780

agagcctgta ggttaggcatt cgacgcgcca tagttggact ggccaggatt gccaataact 3840
gcaacaatgg acgaaaacat gatgaagaag tcgagcgcct tgctgcccgt ctgttcggag 3900
aaccgttcat gaagaatgcg tgctccttgt accttggct tcaacaccat gtccatcatc 3960
tggtggtcca tggttttcag catgacatcc tgcaagcacca aaggccgaa cgcgatgccc 4020
gcaacaggtg gcaacttcat atcgacaagg ttgccaaggc cagcatcgac tgaatcctca 4080
ttggcaacat ccctaaagaa agtaatttga taagtaaacg aggatgttgtt agcaagggtt 4140
gatgtgatataatcaactt acattgacag aacggtgatg tcaccaccaa gtgcctccat 4200
gttggcgatc catttggat caagtcgagg gttccggcta gtgagcacaa catggcgggc 4260
gccatgcaag atcatccagc gacagagaga gcgaccaagg tccccggtaa gaccaacaag 4320
caaatacgtc ttcttggataaaataagtt accagagtgc atggggcaaa tccttagcgga 4380
cacctcattt tccttccagt cgatgacggt ggccagattg aagcgttgtt catttgttgtt 4440
gacagagagc tgaccaggca agagaatttgc tggtggctgta ataacttct cagtgctc 4500
gacagtcgac gcagagacgg tatttttgc cattgccaca gagtgctcga ggatttggaaat 4560
atcctaaca tgactaactt tgtatgtgga agctgtactt cggataagat agtcaccact 4620
gtacatgaag caactgggtg gtagcaactt ggccaaacgg ttggttatcc cggcagcagt 4680
ccggtcggta gacaagtcaa agaatgccat catgttgc ggcaggctgt gttcagccg 4740
agcgtcggtt tccttggcat gtaatcgat ccaaggagcc ggaatagtt tgacgtcgga 4800
cagagttttt gccaaatgaa cctgaacacc gtaggttttgc gccgactcca gaattgcttt 4860
gacgcagaag attgggggct ccataatcag aattgtatgca tcagagccaa aggactgagc 4920
gctagagaga attgtttcgg caaggaggc tgcaagctgtg gacaacaaga aggaactatc 4980
ctcgccctcc gccatgttat cggcagact atgcatgtat tttctcggtt catgcagttat 5040
agatccatttc ttctcagccca gggcgactac aggcacctca catgtattct ccagaataact 5100
gccctgcacg acatggaaatg atccgagatg gcccacgcga attgcctggg gaagagcgta 5160
gcgaacacga acagttgctt ttccagcatg acgagctct tctaacaat cacacgtctc 5220
gtttgactca agatagtaca tcgatgagga tgctccctc gcctcttca gtcaatggc 5280
cgtcttggac gaattaaagt taccgaaaat tggacgacga gacgaggatca tacggtcgtt 5340
cctagcaata tcctgcttca aacgaggac ccaggcacga cccttgcacc agtacacttc 5400
gggctcatga gtccatgtta ttgattccaa aagctgatca tcgctcttca cgaagcgcaa 5460
aagttgctca acgaagaatt tggtgtctag gtttccaca gtatcgacat cgaagacgtg 5520

cgcccccaag tcagggttct cgagctgat tgtcctcaac attccgatgg tgctggcctg 5580
gtggggatga tcaatccagg cattctctgt cagccacate atgcgtccgg cgtagaagag 5640
aagagacttg actgcctcaa acttgtcctc ttcaagggtt caaaacactt catcatcaag 5700
ttccgagagg atgacaaaag tcgacttagg ctgcaaggcc gggtcgtcga gaacacttc 5760
cagccgctt acggagtgg a tgtgtctatg cggttagggca gctttcatgt cgttcaaaat 5820
gcgttcggtt tttgtcgatt cgccaccat aaccactaat ggccgggtatg agtccttcaa 5880
tggagcagaa agtggatcat acaaacgctc aacggtggca tccacagcat gtgtactgaa 5940
gacagacggg atcaaatcat cctctcgatc aagtgtccga ctatcgacgc cagagaaccc 6000
aactctttt agggtatgct cccattggtc aacggacccc gaggcactca aagcacgagt 6060
ttcgtcttcc aggtccatc gatcagcgaa aagcccagag atgaaggcga ggccgagcagg 6120
ctcgcgatgg gtgacccga aagtaaccaa gtgaccaccc ggctttagca aggaccttat 6180
gtgagccaat tttcctcga agttggagct ggcatggagg acatcgatg caataatcag 6240
atcgttaggag tgaggcttga atccttgctc tgctggctt ctgtttagt ctgtgcctc 6300
aaactgcattt agaccgtcga attcgaaag ttgttacgg gccttgc当地 taacatccgc 6360
cgagatgtca gtgcaagtgt aactgttga accaagttga ggtgatgcaa gaacgcgc 6420
cgtggcgatg cctgtaccca agcctaaaaa gcaacgaca gattagcaaa ctgcctagtt 6480
acttacattt cagattcgac ttaccatct caaggatatc aatggattgg tagcgatgag 6540
caatttggct aaccagatcc tgaacgacgt gtattgctga gccaaaggcg agcttgg 6600
tatagtactc ggtgaacaac ccattcggt tcatgatatc caaaggatcc ccgttcccgc 6660
gaacaattga aattaattct ttgcctaccc ttggatcag ggcacatgt gggtgacg 6720
agttgcttca agtaaaaggt taatataaaa gaatgaaaaa acacgaaaca gcttgggtg 6780
taccttac acatttgctc aatgtgaaca gaagtgtcct cctcccaaga ctcctggtac 6840
caactgatggt ggccagcccg agcatggcc tgaacctggt cacaccatc aatgtacttc 6900
tggaaatgga ggtcggtt cttgacggtcg tgggggtta tctggctag gaaggatttg 6960
atgtagaagt aaacgatcc ctgcgtggc agaatgtcct cttgtcccg agctatgatc 7020
aacgtcgac ggtcctccag cagtttcg ggcgtgaggg gtcccccagac ccactttgcg 7080
aagattcggt ggtcggtcga agcagtcggg ggagagaaaag gcttaagac aatgttatca 7140
acttggaaaaa gcttgcgtt ggtcgaatcg tacaccgtga tgcgtccgt caggaaatca 7200
cccttgcgt gttgttgcgt tgcgtcaaaac gcaagctgg tttcaccaga attaccgc 7260

gatatacaga gcgatggaa cagagtca ctgtcaacgt gagtaggcac gtacaatgag 7320
cgtaggcgac gatctcctgg agaggaatac gtcctaatga cagtctgaa cgcatgtcc 7380
aggggcgctg ggtggagcaa gaggggctca ttgcgcaatt catccttaag tggaaggaaa 7440
gccaagggtgc cgctagctt ggagtccggc cttctcatgg tctgcacaaacg acgaaagtct 7500
ttgctgttagt catacccaag gaggtcaagt tcccgtataga agaaatcgat gttgacattg 7560
ttcatctggg ggtactcttc ctcaggtggc ggcaaaagct gcatgcacgg tgcgtcc 7620
ccaagggtta tgacgatttg gccttggcg gatgtcgaaa gctcaacttc cttgccaga 7680
caggaatcaa taacaaattt gaccgtgact tggccatccg catcattgtc actggtgact 7740
tcggctgtca agttcagctc cacggagggtg ttttcatctt caaacacgat ggcttgg 7800
atgctcatgt ccaagatttc caggagctga acttggcgg cacgctcacc agccacattc 7860
atggcagctt ccatggccat aattatgtac ccagcagcgg ggaacacagt ctggcattgt 7920
agcgcatgac cgtcgagcca ttccagatcc cggggcctga tgaagttgtt ccactggaag 7980
gtcgatgctg tgctgttaaga agaaagctt ccaagcagaa gatggggcgc acctccacga 8040
agatgctggc gggtagcg agattctgcc cagtattgac gatgtatgatc ccaagagtat 8100
gtgggcaatg actttgacag gtttgaacg gcacgatcgg gccggactt ttttacgaaag 8160
ccctcggcgt cgatactccg aactccgaaa cgctccaaa tgtatccag acctccagca 8220
aaagcgtcca catcgtaac gtttctgtcc aagcacccgg tatacggcag ctccacaccg 8280
gcaagagcat ctttgcgtt ggcttagacac ggacccttga gagcagggtg ggcggcaatt 8340
tcgatggcga cgtcgattag acgatgagtg atgactgctt tctgcacagc ctgcgagaac 8400
aagaccggag agacgagatt gtcttccaa taagcggca tcacatctg tacagtctt 8460
tgcttgctgg tctcggttggac ggcagagaaac caagcaacac tatcgatacc ttggccatcg 8520
gcaacagcac agtcgcactc cagcaatgcc ttgacatatg gagctgcgc tgggtgcgt 8580
tgatgcgaat ggttggcctt gtcaactctc aagattctgg caaaagtggaa ttcatcctcc 8640
aagacacctt caacgtgtg gatagcatcc atgtcgccgg agaaggtcac actatccgt 8700
gaattgcttag cggcgacgca gacccgaccc tcaaaggctt cgagctgcga tagttccctt 8760
gctgtcatcg acgacatacc tgccgttagc atagccctg tctggccgt tggagaagag 8820
gcatgctccg cggacacaac tccacgcaga tgcgcataac ggatagctt agtggcactg 8880
atgaatcctg ccgcaaaaggc acaggcaatc tcacctgaac tggccgac aattgcactg 8940
aactcgatac cagctgcagc gagaagtgg accagaacga ttgtacggc gcagcataga 9000

ggctgggaga agctggcgag tctgacgttt gaggcatccc cttcaagcat gagctggtca 9060
tacagtgtcc acgttaggccg atactttca ggcagtgttt gcagtgaatt atccagctct 9120
tcgagaatgc ctctcacaaa tggcataccc accatgagct tcttcagcat gcccgccac 9180
tgtgacacctt ggccagtaaa gacacctagt acgcgaggggt tgtcattcgc gtcggtgccg 9240
aagtcggtga cgacccacc gtccgcgtatgc gcaagcctcca gtgccgcgcg ggctacttcc 9300
ttgttgtgtg ctgcaatcgc acgacggaag ggcaagatag accgtttctc aagtaaggta 9360
tatgcgatat catgcatttc cacgtcatca tgcgtttcca gaaattggag catattttct 9420
agcgttgcct tcatggagcg ctgcgacttc gatgaaagca caagggcaa gctgcattgca 9480
tctgcattcg aggtcaccc ttttaccact gctgtcggt ttttggagg agccatatac 9540
tcttcgataa tagcatgggc atttgtacca ccaaattctg atgtgttat atgttagct 9600
aacttcactt tcgttctcaa gaagtgcagt tgaatcctta ccaaattgaat taacgctgac 9660
tctgcgaggc tgcccgccgc caacaatcgg ccattctgtg gcctccgttgc caattttcaa 9720
gtgcgtatag aacggagcga cacggggact gatcttcata aacagcaggt ttggcgggat 9780
cacgccattt cgtacagcaa acgtgcctt cattaagccc gcaataccag cagtgccttc 9840
cgtgtgaccg agaactgtct tgcgtgc gacaaaaagc tcatcttct cggcgtcgct 9900
gtcgattgtt ccattctgtgt gtcgaagaa ggctgttgc atagcctcag cttctgtgg 9960
gtcacccggct ggtgttaccag ttccctggat cttcgttta gggagagaga gactttctgc 10020
aacttcata aggctgatac ttccaggaa taccattac catggccttc aaagaactgg 10080
cagcgttctt ggggttggt aatatcaaga ccagccttgg cattatgtggc ccgaatgagg 10140
gcttcttgcgctatggtt tggcattgtg atacctgtcg ttccgttgc atgggttgc 10200
ccggctcttc ggataacaca ctcgataactg tccccgtcgc gcagtgcctg gtcagcgat 10260
ttcaggacaa tagagcaaac accttcctaa aaagcagttt caggaggtca gtgcattttt 10320
gcttttttggaaaggatggatgcattgtcaacttactcc tctggcatat ccattggcag 10380
cagcatccca cattcgagat ctaccattgg gggacagcat gttcaatttg cttccattta 10440
caaaggatcat gggcccaat atcagattcg caccggctgc aaccggcatg gtactctcgc 10500
ccgttctaaatgttggacg gcaagatgc cggcagctaa ggttgcacta caggctgtgt 10560
cgatcgatcat ctgcagaatc agtcaggaat ctgtcagcac ttgcacgtt cggcgtcgct 10620
caatgagtgg cactcacact cggccatgc cagtcgaaga agtgcatac acgggttggag 10680
gccacactga cagctacccc cgtggcagag tatgttaggaa tactatccaa ttcacgcgtc 10740

acgatagtct catagtcatg cgtcatcata ccgacgtaca cagcagtaga ggatccttga 10800
aggccttgga tccgtaggcc tgcgttggat acagcttcat agaccgtctc cagcagcagc 10860
cttgctgtg ggtcaatcg ttcggcctct ccagcttggaa tgttgaagaa agaggcatca 10920
aaaccgcgta gatcctcctg cagcaagtat gcaaagggtg cgttcgtgcg cccggggtga 10980
gtgccatcg ggctgtaaaaa tgtatcgacg tcaaattctct ccttagggat ctggctgt 11040
acatcccggg gctcttttag cagctccaa agttttagt gtgtgttgc accaccttggaa 11100
aaccgacaac cgcttcccac taccacaatt ggctcgttt gatagttggc ttgatccata 11160
actgctgate ctgttttgg gcgataggat tgggattaaa cttgtcttgcgtcagtaga 11220
tcttctcact gcatgccggg cacaacattt gttttcacag aatcgagat ttgaatctct 11280
gagcgaacaa gccggccttgc acccgatac cgtcgttata ttacttgca cgtatcagta 11340
ctcatctaga ttccgacaat ttcaagatcc attctagtac tcaaattggcc ccacttccca 11400
gcaatgcaag ctcggcacct agcaaaccct cccggcgtca ttgggtgcac gaatagccat 11460
tcctccatac ggcgttattt ggtcacacga ggctgaatga atcaaacgtg aatatcaatt 11520
ggctgtatca aggtgaaacc gagttttca ctcggattgt tcttgcgtc ctcggtaag 11580
ctgctctaa aggaaacaac cgaactgccc catccaggtt aacttcgatt gggggggggg 11640
ttttttttt ttcaagggtt actggaaagag tgctctcgcc cacaatcc cagaagcatt 11700
agtgcgtta ttccgattata aaccgtcgca gcgcgtctcat tcttcgtct ttcttcttt 11760
ccactggtgt gcatagggtcc tatctgtctc acgcaatgct cggccagggtt ctctgaccg 11820
tcgaatcgta ccaatggta tcgacccttc aagcccttgc ggcggtcgca gtgcatttta 11880
gtctcatcgcc taccgttttgcggcc agtccgaact gcaagtctat aatccccaaa 11940
aatgggtggaa gttgacgacc atgagggtca ggcaggactt cgatacgtat ggtccgagct 12000
ggatcgaagc ttggttctcg aaaaacgaca agccctgctc cttcattgtt gattccggct 12060
attgcaccat cctccatcg tccatggccg acgagttcg gaaaatcaaa gatatgtgca 12120
tgtacaagtt ttggcggat gtatgacctc tgaattttcc attgtgttca ctcaatgacg 12180
tctctaagat tctgatgaat gtataggact ttcaactctca tctccctggaa ttgcacgggt 12240
tcaaggaaat ctgccaggat gcacatcttgc tcaacaaagt tgtttgaac cagttacaaa 12300
cccaaggcccc caagtacaca aagccattgg ctaccttggc cgacgctact atgccaagt 12360
tggttcggtaa aagcgagggt aagtgtcaat tttctgtct tgagcattga gcctctggct 12420
gacataccgc gaatataacta gagtgccaaa ccgcacctgt ctattcaat ggattggacc 12480

ttgtcacacg aacagtaca ctcattatgg tcggcgacaa aatctgccac aatgaggagt 12540
ggctggatat tgcaaagaac catgccgtga gtgtggcggt acaagctcgcaacttcgc 12600
tatggcccat gctactgcga ccgctcgctc actggttca accgcaagga cgcaaattgc 12660
gtgaccaagt gcccgcgc aaaaaatca ttgatcctga gattcagcga cgacgtgctg 12720
aaaaggccgc atgttagcg aagggcgtgc agccgccccca gtacgtcgat accatgcaat 12780
ggttgaaga caccgcgc acggcgtggt acgatgtggc gggtgctcag ctcgctatgg 12840
atttcgcccgg catctacgccc tcgacggatc tttcgtcgg tgcccttgtg gacattgcca 12900
ggcacccaga ctttattcag cctctccgc aagagatccg cactgtaatc ggagaagggg 12960
gctggacgccc tgcctctctg ttcaagctga agtcctcga cagctgcattaaagagacgc 13020
agcgaatcaà gccggcgtgag tgcgcacta tgcgcagttac cgctctcaga gacatcactc 13080
tatccaatgg ccttttcatt cccaagggcg agttggccgc tggctgca gaccgcattga 13140
acaaccctga tgtgtggaa aaccccgaaa attatgtcc taccgattt atgcgcattgc 13200
gcgaggatcc agacaaggcc ttacccgctc aattggagaa taccaacggt gatcacatcg 13260
gcttcggctg gaacccacgc gcttgcggc ggcgggttccgc tgcctcgaag gaaatcaaga 13320
tttcctcgc tcatataactg attcagttatg atgtgaagcc tgtaccagga gacgatgaca 13380
aatactaccg tcacgccttt agcggtcgta tgcattccaaac cacaagctc atggtaacgc 13440
ggcgcaacga ggacatcccg ctccctcatg accgggtcta agatataaca cgcaaactaa 13500
aacaatatg catccgtccc caggcttatt ccaatagttt ccgtccaga gaaacttaggt 13560
gctgtattag tcgagtaggt tagtaaaata aaacgcattt tattcgattt tgatgccttc 13620
tttgcataatcg aacgtgggtt agactttggc tatgtgcgag agacagaaac acagagagag 13680
agaaggaga gagtgtgtat tcctgcgtacg cagagccgc atctgcgttct ataccgcag 13740
ctacaccgc acgttagggaa gtcggcagta atgaagctt tctccggta caatcaccga 13800
tctcccttatt ctctcaggcg ttgactggcg cttacatgtcgagggctta ggctctgtta 13860
agtcttgcattt ttcctactca acatccccga cttaggcggaa gagaggacgg cgcaacgc 13920
tggacacaag tactccctcc cgccttccga ctacatcc acaatctgtatccccc 13980
gtgccaacgc ctttcgaccg ttcaacgcgc atttacaagg cttgcgggaa tcataatgg 14040
gagaaaaaga gagaactttt gacagtcaag cctccgaggt gctaagacag cttccctgg 14100
agtataaaaaa gcattcactc ttccgacttc gagaacgagt gcacatgtgt actttgtgc 14160
ttctcaggc cactgtaatg gtatccagg tatctctatt tactgctatc cagaagtcag 14220

gcattaaata gtcaggctca gcccaggctc gattcagatt ggattcaggc ttcagaccat 14280
ggccgctatg ctccccgtta ctataacctcc gtcgagctat acccgcttgg ccagacaaaa 14340
ggcttcactg aacccttcaa cttaactgca tttcgccaca actaactcga cgaggccggc 14400
gatggtgtta ccattcatga gctcaaagat cgacacatca acatggatt cagatgtgat 14460
ccagttcga agttcaatgg cgacgagtga gtctacgccc acacctgcca ggaaaaatgg 14520
cgaggacatg tcgtcttctg ccagacaaaa cattgcatac agctttccg tcattgctt 14580
gaggacgata gaaaatggcct cgtcgtgaga ggtgaccctg ctttagttggg cccgcacgcc 14640
atctggcct ttttatgcg aagagacaaaa ggattggct gcatgaagga cttggcggt 14700
tttaagtccc acaaaccgct gttcctgtat ccagttgcc tcggtccagt gaggacccgg 14760
ggatgtgttg attcctgtaa ccacagctgc gggaggtgat gggaaatttgg gggaaagaaca 14820
caggattgcc ttctccaaca catccatgac gtcctttca tgcataggct tgtaacctat 14880
tctagcgagc cggtcggcca caccacggcc agttcagcc acgtatccaa cagacttgac 14940
catgcccag tcaatggtga cagccggcat gccatgggct ctccgggtt ggcgcaagtgc 15000
gtcctggaat gcaccagcag ctgcgttaatt ggcctggcct gccccaccca tgaccccaac 15060
aagggtgag agcatcacga agaagtcaac atcctgtgct atcttggaa gataccaaact 15120
accctgtact tttggcgtt ttgctgcatt aaattcatcc aatgtcattc ggcgatagaag 15180
cgcgcccttg agaaccatgg cacettgtat gataccctga attggcggtt catgtgcttc 15240
ttcgcacaac cggagcacct tggtgacactg atcttgcattt gagatgtcac atgcgtgttag 15300
atagacagcg cactgttgat tttgcaagct ggttatgaat ggactggcct ttgcacttct 15360
cgataggata atcaagtgt tcgcgcctg atcaacaagc cactgacaga tctgctttcc 15420
aattcccccc agcccacccag caacttaggta agaactgtca ggcttcagct tcagcgagaa 15480
ccctccatcg ccgactggga ccagttcgct cccagataca ttgaccacaa ctttgccaaac 15540
atgctgacca ctctgcacatcg tacggaaaggc cttctcgatg ttgacaagg agtgctgt 15600
gattggacca atcaagccaa tcgctttgt ctcgaggagt ttgtgacat ggtcaacgc 15660
ttcgataact tcctcacttt tggcttttgc ccacgagaga agatcaattt atgtgaaaga 15720
gacgtcccggtt gtgaatggca gcatgtcaag tctgctgtt tgctccaggcttcc 15780
aatctcaaca aatctgcccga attcgccat gcagtcaaag cttgcttggg ggagttgacc 15840
tgccaaatgag tttagaacga catgaacgcc aagtccgccc gtgtaggctt tgatgcgtc 15900
gacgaataag tcattcctgc tcgagaagat atgatccgga ttgatgccga atttatgcc 15960

gacaaaagtca cgcttggcgtt gagttccgc tggacgaag acctcgac ccgcaagctg 16020
ggacaaaaatg atcgctgcgtt gaccgacgcc tccagctcca ctgtggatca agactcttc 16080
gcctcgctgt agctttgccc tggtataaag cgcaatatat gcggtagtga aagccagggg 16140
gaccgaagcg gcttctggga agccatttc gtccggaata cggacgacat tagtgtacgg 16200
cgtctgtgtt ctggtcgccc aatggcctt cagtagtgca catacgcggt cccctaact 16260
gagggcttgg ctagcggcag cagctccacc gagctttgt atcaactccgg cgcattcgaa 16320
gcccatcaca cggttggcct ccaattgacc catggcaacc atgacatccc gaaaattgag 16380
accgaaaagct ttgggttcga tttctaccca atcatccgg a gatccttgc cttcacgtcc 16440
ttcgtcgctc c gaaattgca gggagtctaa gagccctggc gtctcaacct ccatcccgag 16500
acgacgcccgg gtttgcgtca acggctgcag tggacactca accgcttctt ggtccttcca 16560
gtgcgggtca ttgaaaagtc gcggtacgtg gatgacgccc tttctcttg caaattcaaa 16620
ctccttgcgtc tcggaaaggt cgccgaggcg gccattgaag atattcaga tagcatacag 16680
ggactcgtgg gtgtatgcgt ttcgagaagg atcgagatcc aacgatacat attccttccc 16740
gttattttcg ttgcggatgg tacgcagcag accaatatgt agagcttcc atggatcctc 16800
ggagctcatg gctgctcctc tagacaccca gagaagtgcg ttgcagttat tcagcatgc 16860
gggtgatggat ttgaaggctc cgcttccac ctctccaagg agcaggact ccatttcccc 16920
aagaaaaatg catgtccctc cagtggtatc tacctcgccc agagcgttga tcgatggc 16980
agaactggtc tttcacaaa ttgctgcctg gagacttcc agccaagatg aaggaggcgt 17040
gagcgctccg tgca gcaaaa gcacctccga ttctgccact gtatccgggg ttgtattctc 17100
ttttctagcc gtcgatagca ttgtgctgat catgtaaaac tcatcgctt cacaatcag 17160
aacctccaat tccacacccgt tgaaaccgct cgtgtccaa acatggttcc aaagatcggt 17220
agtgagcgat ggctgcgact tccgctcagg ctccctactg agccaccaac ctggcaacag 17280
tccgaaggta aagaacaaat cgagctgatc cctggtagtc tcaaccaaaa tcaagttgcc 17340
cccaggcttgcg agcaatttc gaaacgttact cagtggttgcgt ttcatgcatt gagttgcatt 17400
caggacctgg caagccacga ccacatcgta ggtggcacat tcaaaccctt gttgctcggt 17460
atcgcttca atatccaaatt ttttggaaatg catcacgtct tgccaaatccg caaattgctc 17520
acgcgcccac tcgaaaaacc cggcagacac atcggtgaag tcataacgat cgatcggtt 17580
ggtgtttccc aatgcattga caataagctt tgtgcagccg cccgtgcctc cgccaaatctc 17640
caaaatgcga gaacgcgggt tcttgcggc gcaagtcgg atcagctgc tggcttgc 17700

gtttgatcg ctccatttga ttgcgttgac gtagtatctg cttagcagct gatcttgc 17760
catcaactca agtggctctg tttcgccggcg tagcattgct attaactgag gtcctagacg 17820
agaaaatcatc tcgccattga cgctttctcc agcgactctg gcctgttaggc atttcttctg 17880
ctcagcatacg tcacttagcc agtcgcaact ggctgggctg agcttgggg 17940
gtccaaattgg acattcatcc aatcgaaata cttctgaagg tggccatcca gatgttggat 18000
atcagaattt gtcaaatacg tgacagccctc ctgtataaag ttgatcgtgc atcttcggag 18060
gtccatcatg agttccgttt cttcgtctc agcctcagtg ctcaactttt cttttagcc 18120
agtggagtca cccaaagctga tgtcaggggc ccaaaccagg gagctgcagg catttctgt 18180
gtcgttggag tctgactttt ggtcagagaa gctgcttcca accgactgga aaacaaggcc 18240
ttcaatctct atgactggga ttccgtccga gggagaagaa ccgctatcat agtcatcaaa 18300
caactgccaag tcggtagaga aggattgaga gttgcgatcc ttgatgctgg cctgtgcgtc 18360
cagagcatca ccagcccttca agtcagccag gctagaggat attttgacat ttcttagcct 18420
ccttggttacc atggccgttt tcatacgtgt tcccgcgtag ggtaacacccg tgtatgccgc 18480
ctggatcacc gagtccagag tagtaggatg gacgatgtgt cgattctcgt acgaggtagg 18540
catagccgag gcagtgtcag caatggaaaaa tctgcaaaac gagccctgtc cattttttg 18600
aattcgctga atgttctgaa aatgggtcc gtggcatatc ccattcgcgt gtaaggactc 18660
ccagagatcg ttgggatcaa tgctccgggtt atctgagcct agattcaacc tgcgtgaggg 18720
ttccacagttt gaacagtcaa ggtggcttctt ttcgcctctcc gaacgttatta atccggtgca 18780
gtgttctgtc caggtattat ttgcggccga aattgagtgc acagaaaaatt gatgccagtt 18840
cttgcgtcc agggaccttt ctcacatga acggatcggtt aggccgcaggtaaacctctgc 18900
ttctgcatac gccccgttta tgagagcctg cgcgagttca acgtcacgca agttgttagtt 18960
gatgctagcc cccgcaactg gtgggcagac ttgtgaaaac ccctcgatgg ccatgctgat 19020
gaagccagct cccggaaaga tgatgctcg accaacgacg tgatctcgta tccatggaat 19080
atctgacaga cggagaacat gttccattt aggccgcggaa tgaggagaga gagattcccg 19140
tgagcctatc aaagtgttag gcggatgggt tctctgtttg gactcacgac tgccgcgagg 19200
ctctctccaa taacgggttt ggtgattccacgggtacgcgc ggcaaatcgc tcagtagctt 19260
caactctggc tctttcttc catgaggaaa gtttatagcg tccatggatggccataacc 19320
cttgcttatac aactccgtag cagcacgata cattgtctcc aacgagcttc tgccgcgaga 19380
aaggcaactg agatagtttatactgtttcc tttcagaccc agatccctgca tgacttgggtt 19440

gattggacca ccaagcgctc cgtgaggccc tatttcaata atcacatcga cggctttctc 19500
tttggtgttg ggatcaaagc acatctcgcg gagtgaggac tcgaactcta ccggctgttag 19560
catactatcc atccagtgtg tgggatccaa tagcaattta agatcggtca tgcgactacc 19620
agtcttaggt gatgaatata atacaccctt tgaggtgtca gcattggat tgcgttgtt 19680
gttatccgag ttgaacagat ctctcagtga cgccccaaag gcatctgccaa ttggtcgcat 19740
gtggcttcaa tggaggctt cagtgacttt cagtttcctg gttaaagatgc catcgccgt 19800
taacaacttt tcaagtttct cgattgcacc caaatctccc gacaccgtca cactacattt 19860
actgttata catccaacca ccacacagcc gtccctcctgg ttgagacgca aatgtaaac 19920
attggctca ctgcgaccaa gaccaccgc catcatcct ccttggctg ccaatgcggg 19980
cttgggctta gtggtcaata caccgcgtat ataagtgate ccaatggccg accgcgcgga 20040
taaagccccca gctgcgttagg cagcagcagc ctctccactt gagtgactgg ttatccccgt 20100
tggccgaatt ccccatgacc aaaggagacg cacaagtgcata ttggatag cggttgcac 20160
tggtagactg tattcggcat catttaaccccg agtgcgtcagc tcatcacggg ggagctcctc 20220
tgtgcaattt aatgttagta cctcaagctt gatacagtat tactttccc gggctcgca 20280
cttaccata aaattccaaac tcgcgcccag ttgcttgatg tagccatcac attcaagaat 20340
cgcctgtttg aatactggaa atgtattgac cagctctcg cccattgcatt gccactgcgc 20400
cccctgaccg gtgaatacaa atccgagccg tactttctca ttgcgtcggtt ttgggttatt 20460
ggactcatcg ctgaggcag aaacaaggcc gccaaggctg tctgctacat acactgacgt 20520
ccatggcaga atgaaacggc gagagcctag tgtataggcg aggctggcga ggaagggttc 20580
cccgtaatg tcagcgacgg atttaatgtt gtctcgagg cttgctatcg ttgcggaca 20640
agcttgcgtc tccttggcac gcacaacgtat tatgcggctc tggggatc acactcaac 20700
cctaccatgc tcagagttac cattgacatg cacttgatcc tctggcagg ccaatgatgc 20760
gcgatcatat gattccaaaa tgacgtgagc attcgaacca ccaaagccga agttattgac 20820
agatgcgcga cgagtcccat cttcacagg ccagtcttgc gcaagatgg ggtatcttgc 20880
aacattaacc tttgaaacat ataactgaat ctgcgaatgc gcaaaggctt accttgcgt 20940
tctttggtc aagcatcagc ttgttgttct tttgcaggaa ccgcgcattt gggggatca 21000
agcccttctc caaggccaaag gccaccccttgc ttatactggc caggccactg gggcttctg 21060
tatggccaaat atttgcgttca acagagccaa ggtgcagagg atgccttta aaagctgcgt 21120
aaattgcgtga gatttcaagg gggtcaccag ttgggtttcc agttccgtgg gcctccacgt 21180

acgaggtaaa cgacatatct agccccagcct tatcgtaaca ctccctggatc agactttct 21240
gcccacatc actcgccgca gtaattgcgg gtgtttgcc atccctggttc agcgctgtct 21300
ctcgaatgac ggctcggata gggcttgggt ctcgcaacgc gtttagggagg gcctttatta 21360
ccagagcggc aattccttcc ccgcgaccat atccattcgc tcgaggatca aaagagtacg 21420
agataccatc cggggacaaa aatctgtcat tgagcaacaa ggattgctta gttcaagact 21480
ctcgatctgg aatcttcttc ggaaaactca ccccagggtt gacatcgtaa caaaaacatc 21540
gggattgagc agaagatttg caccgataac gatggctgta tctgactccc cagtagtcaa 21600
gctctggcac gccaagtgcg gtgcggtcaa tgtcgctgaa caggccgtgt caaccgtcac 21660
gctgggacca cgtaagtcgt agaagtgtga tatccggttc gaaagcattt ttcctgagtt 21720
gccagttatg aaataacgcg gaactgtctc ggggtcacga ttgagcgaat cctgatagtc 21780
gtggtacatg acaccccaa acaccgacgt attagagcct gccataccat cgatggtgat 21840
accggctgga tcatggtcag tgacgtttgc ttacagttag gatgacccac actacataacc 21900
actctccagc gattcgtaga ccacctcaag cataagccga tactgcggat ccatgcactg 21960
tccaatatta gatctctgctg tcccgggtt gatcaatttga aataatcata cgctggcgac 22020
ctctgtggtc atgttgaaga acgcggcggtc aaataaaagca ggatcctcgat cgatgaagt 22080
tccaccctt acgtgggtct atccagtcat cttggagtc agtaaccaag cttcagtgat 22140
gctcaaatct tggtaaat attcaaaaaca agatataat gcatgcatgt tagatactca 22200
cgacccgac ctttcgcca ttgggttgtt atactcctt cacattgaat cgcgaggagg 22260
ggaccttaga ccaggcactg cttctctttt caaccatttcc ccaaagcttc tgtggactcg 22320
ttgcatttcc agcaaatttca catcccatttca caactatggc aatggcggtt gatgtgttag 22380
agcaagccga gcctgccatt gcggttgcgg ttgcgggttc ggttgcgggtt gcggttacgg 22440
cggggtatt gttcatttca acgttgcgtt attgactgat atatcgtcg ccctgggtat 22500
aaaaccgtt atagtcttcc aacagtctac aggtccctgg catagctata gatgcataag 22560
ctgcccccgaa cacgtgatttca atagttcggtt gtttgcgtt atcttggacg tgacacgata 22620
ttcgctctgt gcccattggaa aaccccggtt caccatgttca tgctcggttcc aataccttag 22680
aggtaccgggt tcgggaggca ttgtctgtcg tcacgataat cccgagtcaaa acgcccgtt 22740
ggaaaccgttca aacaaagacg aaacaggtaa ggccggccag gtgtttcg ggtataatgg 22800
aggctgtcag aatccgatac tccgtacaca gatgcgaaat acgcatacga gctatcaaacc 22860
caaacgaatc caaaaggctt ggaaaagctt ggaaaggctt agtggtaat cctgtcccaa 22920

ggtttgttga gggcctgagc gcaggggtggg tcctgttaagc agttggtaat tcaatttcca 22980
acaatacacaca atccccaaaa ttgcattat cggttacta agacaagcaa acaaaaatata 23040
tgccaggaaagc gcaattcatc gcgagcaaac gatcatcatg agcatgtgac cctttcctct 23100
tttttctact tcggaaggcg gcatgatcat ctgtcagaac tcccaatcgag gagcaatacc 23160
ataccttagc gcaccccaact cagaccatg cacaagaaaa atccatgcgc cgaatattga 23220
agccttggca acaaagcccc gtgttaactcc gaaggatcc aaagaccgag agacgccat 23280
ttgagagaca cgtacggagg tccacacaaa atgttcccga gtctatacac tatactccaa 23340
actgacttct tgtctacctg ggtatcttgc ttaggttgcgt gtttactgag ataaatgata 23400
ccgggggggg gggggggggg ggggggttgc ac tggcttt cgtggacaga ataataccca 23460
tacatccctg cgtaagttagt cgtttcgaga agaatgtgtt tcgtggtgca ttactccgt 23520
ggcacaatat atttccattc ctcacgaagt ggcctcgcc gggcgtgatc gatgcagctt 23580
gccgccccac caaaaaagga ccacaatacg agtcagatta gaaacgtcta acaggacgtc 23640
tatgttaagag gacgctcctt tgtatgtcgg atctaggcat gacaaaataa ctatacctag 23700
gtagtgttct gtcttattgg tcatttggcc tactttcgga acaatcttgg aagttcacat 23760
tcctaggtat cagggcaatt gattggtgcc cccagaattc tttttctcg aataaaggat 23820
aaatttatgc ataaaaaccc tggaaactga gcatagttt gaggacaaat actagtttc 23880
agtgcattt gtcctactat ccttgcttg gtaccctta ccaattatac cctaggcagc 23940
agttgacacc ggtcatgaat ccattcataa aggtggacca gatgcaggga taaggaagcg 24000
aatcttccg ctgcctcagc ctcagggcg cgcgcattt gtttttctt tctactcatt 24060
tcccgtaccc aggaactgtt cagttgtccc tcccaacccc ttggggccgaa caacccct 24120
ccaaatctacg acggcagatt ataccttaggc gcctaaccga ttaggttgc tattcgattt 24180
tggaggtatg cactttatct caagccctaa ttcccaattt aagtgcctt ccgtccccat 24240
ttgcagagct gactagattc ttttctcaga gactacctag ctataggtac cactccaagc 24300
tgttagcacag acctttcagc atggtcgtt cgttgcattt ctctcgctt cgcggtaggg 24360
aatcaatgaa tcagcagcac cctctacgct cgggaaatcg ggcattgacc tccacactcc 24420
aatttctatc caaaacggcg tgtctacacc cgatccatac cgtttgcacc atagctattc 24480
tagctagtagtac cacatacggtt ggactactca aagacagctt cttccatggc cccgcaaaacg 24540
ttgataaaagc agaatggggc tctttggtcg aaggaagtcg aagcttgc gatccacc 24600
agaatggctg gaagtggcag agcttcgacg gggatgcaga tggatgcaga gatccacc 24660

atcaaggact aatgacacctt g tattccgg ggtcatatgg gttgcacatct caagcagcct 24720
caccatttc t gctccccctc cctgtgaacc tatctgtat tgaccttccc tcaacgtcg 24780
gcccttaac cgccatttcg aaagataaaag tttcgccctt ctctgtggaa tacagcagcg 24840
cgccggaaact cgtggctgct gttcaagaaa tcccaacaa cagtggcac ctgaaattgc 24900
aggagacgca attgatcgag atggaacgcc agatgtggat catgaaggct gccagggctc 24960
acacaaaacg cagccttgct caatgggtgc acgataacctg gacagagtctt ctgatctta 25020
tcaagagcgc tcaaacgctc gacgtggttg tcatggctgct aggttatata tcaatgact 25080
tgactttcg ttcactttc tcagcatga aaaaattggg atcgaagggtt tggctggcta 25140
caagcgtcct tttgtcgta acattgcct ttctcctcgg tctcgacgtg gccataagac 25200
taggggttcc gatgagcatg aggttgctat ccgaaggcct ccccttctt gttgtatcg 25260
ttggctttga gaagagcatc actctgacca gggctgtttt gtcctatgct gtgcagcacc 25320
gaaagccccca gaagatacag tctgaccagg gtagcgtgac agccattgct gaaagtacca 25380
tcaattacgc cgtacgaagc gccattcggg agaagggtta caatatcg tgcactacg 25440
tggtcgagat cctgcctta gttatcggtg ctgtcttagg catccaagggtt gggctacagc 25500
acttctgtgt tctagctgca ttgatcctgt tctttgactg tctgctgctg ttacattct 25560
acactgcgat tctgtctatc aagctcgagg taaaccgcct caaacgtcat atcaacatgc 25620
ggtafcggtt ggaagatgag ggtctcagtc agcggacggc ggagagtgtc gcgaccagca 25680
atgatgccca agacagtgca cgtacatatc tggatggcaa tgatatgaaa ggcagcagt 25740
ttccgaagt taaattctgg atggtcgtt gtttcctt cgtcaacctc gtcaacatcg 25800
gctccaccct tttccaagcc tcttcttagt gatcggtgtc cagttatca tcttggaccg 25860
aaagtctgag cggatcgccc attaaacccc cgcttggcc ctcaaggta gctggaaatg 25920
gactagatga actactttc caggcaagag ggcgcggta atcgactatg gtcactgtcc 25980
tcgccccat caagtacgaa cttagatatc cttccattca ccgtggtaacc tcgacgtac 26040
acgagttatgg agttgggtggaa aaaatggtcg gtagcctgct caccaggctg gaagatcccg 26100
tcccttc当地 atgggtgtt gttgcacttgccttaatgtgt cgtctgtac agctatctgt 26160
tcaaggccgc cagactggaa atcaaagatc ctaatctccc gagtcacccca gttgatccag 26220
tttagcttgc ccaggccgaa agcttcaacg ctgcccagaa ccagaccct cagattcaat 26280
caagtctcca agctcctcag accagagtgt tcaacttac caccaccgac agtgcacgt 26340
atgcctcatt agtcttaatt aaagcatctc taaaggtcac taagcggca gaaggaaaga 26400

cagccactag tgaacttccc gtgtctcgca cacaaatcga actggacaat ttgctgaagc 26460
agaacacaat cagcgagtgc aacgatgagg atgtcggtgc cttgtcttg cggggaaagg 26520
ttcccggtta tgccctagag aagagtctca aagactgcac tcgtgccgtc aaggttcgcc 26580
gcttatcat ttcgaggaca ccggctaccg cagagcttac aagtatgctg gagcactcga 26640
agctgccgtac gaaaaactac gcctggaaac gcgtgctcg tgcatgttgc gagaacgtt 26700
ttggctatat gccagtcctt gttggcgtcg ccggcttat tttatcgac ggcaagagtt 26760
atttcattcc tatggcaacc accgagggcg tcctcggtgc tagtgcgtc cgtggcagta 26820
aggcaatcaa ctcgggtggc ggtgccgtga cagtcctgac tggcgacggt atgacacgag 26880
ccccgtgtgt gaagtttgc gtccttgc gagctggtgc tgctaaagatc tggctcgatt 26940
cgacgtcgg ccagaccgtatgaaagaag cttcaatc aaccagcaga tttgcgcgt 27000
tacaaagtat gcccacaact atcgggtatcacttata tattcgattt aagactacta 27060
ctggcgacgc tatggaaatg aatatgattt ctaagggcgt ggagcatgca ctgaatgtt 27120
tggcgacaga ggcagggttc agcgatatga atattattac cctatcagga aattactgt 27180
cggtataagaa accttcagct ttgaatttgc tcgatggacg gggcaagggc attgtggccg 27240
aagccatcat accggcgaac gttgtcaggg atgtctaaa gagcgatgtg gatagcatgg 27300
ttcagctcaa catatcgaaa aatctgattt ggtccgtat ggctggctca gttggcggt 27360
tcaac gcccacatgccaat ctggcgccag ccattttcat tgccacaggt caggatccgg 27420
cgcaagttgt ggagagcgt aactgcata ctctcatgaa caagtaagtt gaaagcggcc 27480
gtttacttgg aaacattcac taatccgtt tagtctcgcc ggtcgcttc aaatctctgt 27540
ctccatgccg tctatttggg ttggAACGTT gggcggtggt acgattctgg agccccagg 27600
cgcaatgctt gacatgctt ggtcccgccg atcacacccg accactcccg gtgagaatgc 27660
acgtcaactt ggcgcata tcggaaagcgc tggggggctt gggagctct cgctatgtgc 27720
tgccctagcc gcccgtcacc tggtaaggc gcacatggcg cacaaccgtt ctgccccggc 27780
atcttcagcc ctttcgttgc gttctcccc gtcaggcgga accaggacag tccctgttcc 27840
taacaatgca ctgaggccga gtgtcgacg tactgatcg gtcgacgtt gattaggtcg 27900
aatcttagg agcattccaa gtcgggttcc cccctccaggatg gattcattgc aggaggatca 27960
tattttctt cattgggtgt tattgtcata atttcaaaa gcacaatgca atgagacagg 28020
cagggttag agtgaacggc cagaaagggt atctcatgtt tataatgttgc tggaaatttac 28080
gatgcaagta gtagggaaaga agaatatata aagagatgtt cctttccag agagtgtt 28140

ggctctgatcc ctcataatta tttaatgagt gaaagcttg ttcaagctat aacttactga 28200
gtagggttgc aa tttgtatctg attcattcct gaggtatcat gattgatgcc tgaaacatca 28260
atcatccatt gtcagatgcc gtaactaact aactatgaat ctcaacatag ttatatgtt 28320
ccaatcttagc cacggtgact agaaccttga gatggactta gactagacat gggtcgcggg 28380
caatgacata tagaatctt gaaatcgaca ttaattaagt atgtggagat tctttgtgga 28440
ggcacggtaa tgtgtctatc tagcaacgcg gtcaagcatc agtctcaggc acagccggg 28500
tgtcgaaaa gtttgcaatc ttccgcattt ccattccaaa ggcaaacaca aacgtgcacg 28560
ccgttagctcc cactgctaag taaaaagtat gatcaacggc gagactgtaa gctttacaa 28620
ccccctggaaag gttattcttgc tgaccacat ctctgaagcc agtcgcccct gctgccgtca 28680
cggcctgcgt gtcgacagtg ggccatact tgctcaggcc agttctcaaa cggacccaa 28740
agacaagggtt agcaaagtcc aggaagagcg atcctccaaa cgtctgtcca aacacggcga 28800
gagaaaattcc gagggcacct tttcgccgaa agcgtgct ttggatggcg atgataggct 28860
ggccatttag tattgatgtc agcgtctagc gttgcatgc tcttcttgct ttgatacaaa 28920
gccgaaagcg tgagagatga tcaaaggaaa catagtttac cgtttgcattt ccacaaccac 28980
gaccgaagcc cgccataat tggtacatga cccatttac agttgtatgtt tggggcttgg 29040
aggtggatac cagacctgcg cctatggcga cgagaacagc gctgcctagg gcccaaggca 29100
aatagtatcc tgtcttcca actgggtgcgt catatgtcag tatacacatgat atccaagccc 29160
gatgtcagac gttgtggca agaaaggagc catagaaatg gacggggtgg agaaaaatgt 29220
gtacgcgagt ttcacttact tgcaagccaa gaaaccatag ccataatgac ttgtccaaga 29280
attccaggca acatgtacac accactcagt gtgggagaaa catccatttac agcctggaaag 29340
tagatcggtt gatagtagga aaagacaagc aaggagccag agaaaaagcc cataaataaa 29400
caagagcacc acacttgcg tttaccagcc actgagccag gaatcatggc aacagcatcg 29460
ccaacatgac gctccatag cacgaacgc atcagagcaa accctccgc acagaacagg 29520
ccgatgtga cggacttcg ccaggtgttag gtgcaccctc cccattctag tgcgaggaa 29580
atcatgggtt cgaaggctgc aaagaccaca aagcctacaa ggtccagttt gcgaagtgtt 29640
gattttatgt tggccattgg tttgtcggtc gagagttgcg tgcgttggaa tgaaattcgg 29700
tcgggtatgg tggatgacgag aaggaggaat gcagcgacag cgccgatggg gagattgata 29760
taaaaggctg aattccaaatg gagaacatgg acaacaatca taaaaaggcc aaaggtcaac 29820
atacaccatc gccaagtggc gtgttgagtg aaagcacctc cgagcagtgg tccacagaca 29880

atggcaatct gactaactga aaacatattt tcagacgacg aaccgttcgt ttggggtaca 29940
tcagatctt agatgacata cgaccatca tcactccaat caaaaacttca tatgcgaggt 30000
cagcgtgtac acggcaccca gcagacttcc aaaaatcggt tcccttacct ggttgcttgt 30060
gcttaggagc agctgttag aggattgtga gggctccgtt gacaagacct gagcctccca 30120
ttccagcaac ggcccgcaca acaatcaaca tggtggaaga tcttgccgca ccgcatacgca 30180
ccgaggcttag ttcaaaaata cagaggaagg caaagaaagt gtacttcaag cccaagagtg 30240
tatacaattt accggccagg ggctggagag cacagctaaa tatgatgtta gctaattctgt 30300
tcgtacaatg aacaaggctca aggagaacag agccatactt agccagaaga taagcactgc 30360
cgtaccaccc tacatcggtc agagagtgg aactcgcttgt gatatgtggg attgcctgtg 30420
gctggagtca attgactgtg ctgcgtctg ttctgaggtt gccaccatct taccgtgacg 30480
ataatggaca tatcaaggag catcaaaaat gctacgaaag taactgaagc aaccaccagc 30540
ccgagcttga ggcctgttat gtgctggac ttggactcag tgcgttcgag cgtgtcattt 30600
tgactttctt cttctgtgg cttgggttcc cttcttttag gggtagagg ttctgacatc 30660
gcgcatttcc ttccgacttt tgcttcaagg ggcgggtgtga atctctactg cggccgctt 30720
ctatagtacc tgtgtttgg tgtatgaatg atctcgctt cgtgtttcg ttaaggcgg 30780
ctagcctgaa gtcagattga tggatgggaa tcagggaaa ttggcgacgt cttaatttt 30840
gctttctt gttaccggaa gtgttgcggattagcgtgt ctggcttat ttacgacgca 30900
caagatgcat tgaactggcc ccactgcttag atctcaactg tattgtggtt gtaatttacc 30960
tatactccat attgactggg caggtttga acacaaccca caccggccca tactacacat 31020
tagtttgca tattttctg gggccaaaa aaacccaaaa aggcttcaat attttgcggc 31080
caatggagag tgtaactaat ttggcccaca ctccgggtt atcaatcgga tctcaactgca 31140
tatatgatga aagcaagagg gggcaggaga tacgctttt attggctgtc tgcgcgaagc 31200
tggccaaatg caaataaaaaa gacaaacaac cagctggaaag accggcgac aaacatggtt 31260
tacctaacac ctcgatccc aacaatgtgc atgttaatca atgtgctccg tggggagtat 31320
gaactataac atacgaagca gccattcatg taaaaaaaaa aaccaggcga atggcgctg 31380
tcaacggttt cacataagta ctatattgtt ctaactaccc gtgagactgg agagaacagt 31440
ctcgccgaa gaaacgataa gagcatcggt catatcggtc catctcggtc taagtgtatg 31500
agaatattcc gacgtgaatc catccgtcag tgatcaatgt ctccaagtaa ttcatcattt 31560
caattaccct cgcttactc cgtagaatac aagaccttac tagcgcaaac aagtggggc 31620

taacggtgtg atctcccttcc gttgcggccg ccacctcggt tccagccgta atacgacgac 31680
ccgtctatcg cgaccccccta gccttggcca tttttggcgt tacagtaaag ctttggagag 31740
aaacgccaag ggaaaatgct agccaccaat tctataaatt actcttcaca tgcagctagt 31800
atcaactggta agtctacggg gcacatgtaa aattttatt actttctaat aatcttcca 31860
agtcttttc cacggggccc caatgcttaa aatactcaaa agacgtgaaa aacctgcaag 31920
ccggcagtga tatcacacgt aatgcctcaa cagcctgatt ccgagccatt atatgctgtt 31980
tgatgatctc aaattgagat ggcgagcgcgt ggcgcgtt aattggtagt gggattggta 32040
tagaaacgta agtgcagaag accatgtaa aagtacatat ggaggctatg tgatggcccg 32100
atctagtttc ttcaaatatacg cgtgggtat aaaaaaaaaagc agggctttc tcagggtaat 32160
gtcgcagtct acaacgagtg gcgtccactg acagggaaag gcgcgggg ctatgcatt 32220
ttcaatttcc atagaggggg gatgcaccat ctccgacaat ctatagttac tcaaacaggt 32280
acggtaactaa gcaatattgt gttcttcgc taatgcgaat atttccttat agcaacgtcg 32340
caacacattt atcgctttcc ctgaggcctt tggacttg ggctttcggtt ctccggcttc 32400
gtcaactccaa agcacagata ggagacgaga ggccggcggtt atggttttat ttccagcgcc 32460
aaggatttgc cacgatgtgc ttggcatatc tgataggacc tattccctt ctccgggtca 32520
gcccattgt gatgtatgca agggaaagaaa agactggtgg ttatcggtcc cacttactag 32580
acgaatagat gccgcagccc cgtgcctgt tgctatcccc aaagcagtct caatctact 32640
caatagtcga aggcttacac gcaatgtcggt gcatgcagaa gataaggcgt gcatgaatgg 32700
gtcgagatgt gaaatgagct cggcgtatg aagattagag tgaaacgagg gaagtgcatt 32760
ggctttcca ttgtcatttc tagtgggtga gccagaccag taccaatcca ttctgtgtt 32820
ttgtttttgt ccacaagggtt gggcttcat cacctcggtt agtagcagct gggaaagtga 32880
tgtcatgatt ttgacagaca acatgttagca atgcaccgcc atgaacaagt tcttggttt 32940
cagacaccca tctaacaatgc tgctattgt gctcgatgtc acacgttctt gaagatgtag 33000
tagcaatcta ccaaaggcat taaaaatgc ccctatcggt tctaggaaga agcttagcg 33060
acaatcaaga ggcagtaaac aggccaaatt gaaaatctca cagctaaaaa tttttgtttt 33120
ggccattcc acagtcaccc cgtggagtt tacctctagg tcctgtgaca catccgacag 33180
actttcgaaa aggtctcggtt gcgtgttgcgt tggat tggat acgagttccc 33240
ctctacttcg aggtcaaaca gcgatggcga gacaggcgcc gttgcattca aagggccattc 33300
aaagtcgttag cctagatctg gtatccccga agattcatttgcgttggcat cgtcgacaaa 33360

tgtatggc tgagggcagc cgccggaaa cgactcgga tcataaagt tgattgatgt 33420
atcatagaat tgcagggttgcgcgtatgg ttctgataat gttccttga gtgccgaggt 33480
gccaatatgc gtaggtggtg agcagtaagg tggaggagtc tctgccaatg atgagaagac 33540
cgtagaagat gtcgcggtca tcgggtgtga ggttctgtg gctctttagt ttccagctgc 33600
ggcttcctta tgtaaattgc gcttgggtac ccttcgctg tacacacacc ttaatccggc 33660
tttgtgacaa cggtgacact gaggcacggac taaattggca ttgctaccgg tacattttag 33720
ctttgtgca tgacaccggc cacatgagcg tcgaaacgcg cgacggcgta ggtcgtcgg 33780
aatcggttgc tgcggcaggg acataattat tggattaaga tcaaataatg tgaggtgaga 33840
cttgcgtatgt tcctggatct ttatgtattt gaattggaga gtaagctcgt gcaggagata 33900
agttcagggtc gtcttgctgg aagacttact aagttatatg caaacaagtg tttcgagcg 33960
gacaccaaaa gccaatagtc ttactatgaa tgtctttca gtcacccggaa gaaatactct 34020
tagcctctgc tcttatgcga gctcatcaaa gctggcata cataccccat ccagccac 34080
gtattacact agaaagagtt ctaaaagaaa tagattggc ccccccattctg gctatcatat 34140
atgccagatg aaataacctgt aacgtggggc ataaaaaggc aggctcttagt ctaccagcag 34200
atc 34203

<210> 2

<211> 34203

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 2

gatctgctgg tagacttagag cctgccttt tatgccccac gttacaggta tttcatctgg 60
catatatgtat agccagatgg gggggcgaat ctatttctt tagaactctt tcttagtgtaa 120
tacgtggcgc tggatgggt atgtatgccc agctttgatg agctcgata agagcagagg 180
ctaagagtat ttctccgggt gactgaaaag acattcatag taagactatt ggcttttgtt 240
gtccgctcga aaacacttgt ttgcataataa ctttagtaagt cttccagcaa gacgacactga 300
acttatctcc tgcacgagct tactctccaa ttccaaataca taaagatcca ggaacatgca 360
aagtctcacc tcacattatt tgatcttaat ccaataatta tgccttgcc gcatgcaacg 420

attccgacga acctacgccc tcgcgcgtt cgacgctcat gtgaccggtg tcatgcacaa 480
aagctcaaat gtaccggtag caatgccaat ttagtccgtg ctcagtgta acgttgtcaa 540
caagccggat taaggtgtgt gtacagcgaa aggctaccca agcgcaattt acataaagaa 600
gccgcagctg gaactacaag agccacagaa acctcacaac ccatgaccgc gacatcttct 660
acggtcttct catcattggc agagactcct ccaccttact gtcaccacc tacgcatatt 720
ggcacctcgg cactcaagga aacattatca gaaccatcag cggcaaccct gcaattctat 780
gatacatcaa tcaactttga tgatcccggag tcgtttcccg gcggctggcc tcagccaaat 840
acatttcgac acgatgccaa cagcaatgaa tcttcgggaa taccagatct aggctacgac 900
tttgaaggcc ctttggatgc aacggccct gtctgcccatt cgctgttga cctcgaagta 960
gaggggaact cgtcatccgg acaatccaac acaagcaaca cgcaacgaga cctttcgaa 1020
agtctgtcgg atgtgtcaca ggacctagag gtaatactcc acggggtgac tgtggaatgg 1080
cccaagcaaa aaattttaag ctgtgagatt ttcaattctg cctgtttact gcctcttgat 1140
tgtcgctaaa gcttcttccct agacccgata gggactttt tgaatgcctt tggttagattg 1200
ctactacatc ttcaagaacg tgtgatcagc agcagcaata gcagcattt agatgggtgt 1260
ctgcaaaacca agaacttggt catggcggtg cattgctaca tgggtctgt caaatcatg 1320
acatcaactt cccagctgct actatccgag gtgatgaaag cccaaccttggacaaaag 1380
caaagcacac gaatggattt gtactggctt ggctcaacca ctagaaatga caatggaaga 1440
gccgaagcac ttccctcggt tcactctaattt cttcatatcg gcgagctcat ttcacatctc 1500
gaccattca tgcacgcctt atcttctgca tgcacgacat tgcgtgttaag ccttcgacta 1560
tttagtgaga tttagactgc tttgggata gcacaggagc acggggctgc ggcatttatt 1620
cgtagttaa gtgggaccga taaccaccag tctttcttc cttgcatac atcagcaatg 1680
cgctgaccgg gagaggggaa ataggtccta tcagatatgc caagcacatc gtggcaaatc 1740
cttggcgctg aaaataaaac cataacgccc gcctctcgtc tcctatctgt gctttggagt 1800
gacgaagccg gagacgaaga gcccaagtca acaaaggctt cagggaaagac gataaatgtg 1860
tttgcacgtt gctataagga aatattcgca ttagcgaaga aacacaatat tgcttagtac 1920
cgtagttaacta tagattgtcg gagatggtgc atcccccttc tatggaaatt 1980
gaaggttagca tagccccgtt cgccttccc tgcgtgttaa cggccactcggtt tgtagactgc 2040
gacattaccc tgagaaagcc cctgctttt tttataccca ggcgttatattt gaagaaacta 2100
gatcgccca tcacatagcc tccatatgtt cttattacat ggtcttctgc acttacgtt 2160

ctataccaat cccactacca atttcccaga tccagcgctc gccatctcaa tttgagatca 2220
tcaaacagca tataatggct cggaatcagg ctgttgggc attacgtgtg atatcactgg 2280
cggttcgcag gttttcacg tctttgagt atttaagca ttggggcccc gtggaaaaga 2340
acttggaaag attattagaa agtaataaaa attttacatg tgccccgtag acttaccagt 2400
gatactagct gcatgtgaag agtaatttat agaattggtg gctagcattt tcccttggcg 2460
tttctctcca aagctttact gtaacgccaa aaatggccaa ggcttaggggg tcgcgataga 2520
cggtcgctg tattacggct ggaaccgagg tggcggccgc aacggaagga gatcacacccg 2580
ttagcccca cttgtttgcg ctagtaaggt cttgtattct acggagtaaa gcgagggtaa 2640
ttgaaatgt gaattacttgc gagacattga tcactgacgg atggattcac gtcggaatat 2700
tctcatacac ttagaccgag atggaccgat atgaccgatg ctcttacgt ttcttcgcgc 2760
gagactgttc tctccagtct cacgggttgt tagtacaata tagtacttat gtgaaaccgt 2820
tgacgacgccc cattcgccctg gtttttttt tgacatgaat ggctgcttcg tatgttata 2880
ttcatactcc ccacggagca cattgattaa catgcacatt gttgggatcg aggggtttag 2940
gtaaaccatg tttgtcgccc ggtctccag ctgggtgttt gtcttttat ttgcatttgc 3000
ccagcttcgc gcagacagcc aataaagagc gtatctcctg cccctcttgc ctttcatcat 3060
atatgcagtg agatccgatt gataccacccg gagtgtggc caaatttagtt acactctcca 3120
ttggccgcaa aatattgaag cctttttggg ttttttggc ccccaggaaaa atatgcaaaa 3180
ctaattgtta gtagggggg gtgtgggttg tttcaaaaac ctgcccagtc aatatggagt 3240
ataggtaaat tacaaccaca atactagtga gatctacgag tggggccagt tcaatgcattc 3300
ttgtcgctcg taaataagcc cagacacgct aataccgcaa cacttccggta aacaaagaaaa 3360
agaaaaatta aagacgtcgc caattttccc tgatccccat ccatcaatct gacttcaggc 3420
tagcggacct taacgaaaca acgagagcga gatcattcat acaccaaaac acaggtacta 3480
tagaaggcgcc ggcgcgttgc gattcacacc gccccttgc gcaaaagtgc gaagggatttgc 3540
cgcgatgtca gaacctctac cccctaaaga aggggaacca aggccacaga aggaagaaag 3600
tcaaaaatgac acgctcgaag cgactgagtc caagtcccag cacatcacag gcctcaagct 3660
cggtcggttgc gttgcttcag ttactttcgt agcatttttgc atgctccttgc atatgtccat 3720
tatcggtcagc gtaagatgggt ggctacctca gaacagagcgc cagcacagtc aattgactcc 3780
agccacagggc aatcccacat atcacaagcgc agttccactc tctgaacgat gtaggggtgg 3840
acggcagtgc ttatcttcgt gctaagtatg gctctgttct cttgacctt gttcattgt 3900

cgaacagatt agctaacatc atattagct gtgctctcca gcccctggcc ggtaaattgt 3960
atacactt gggcttgaag tacactttct ttgccttcct ctgtatTTT gaactaggct 4020
cggtgctatg cggtgccgca agatcttcca ccatgttgat tggggcgg gccgttgctg 4080
gaatgggagg ctcaggtctt gtcaacggag ccctcacaat cctctcaaca gctgctccta 4140
agcacaagca accaggttaag ggaaccgatt ttggaaagtc tgctgggtgc cgtgtacacg 4200
ctgacctcgat atatgaagtt ttgattggag tgatgatggg tcgtatgtca tctcaagatc 4260
tgatgtaccc caaacgaacg gttcgctc tgacaatatg tttcagttt gtcagattgc 4320
cattgtctgt ggaccactgc tcggaggtgc ttctactcaa cacGCCactt ggcgatggtg 4380
tatgttggacc ttggccctt ttatgattgt tgccatgtt ctacttgga attcaggctt 4440
ttatataaat ctccccatcg gcgcgtcgc tgcatccctc ctctcgta tcaccatacc 4500
cgaccgaatt tcatccacgg acagcgaact ctgcacccac aaaccaatgg ccaacataaa 4560
atccacactt cgcaaactgg accttggtagg ctttgggtc ttgcagccct tcgcaaccat 4620
gattccctc gcactagaat gggagggtc gacctacacc tggcgaagtt ccgtcatcat 4680
cgccctgttc tgtggcgag ggtttgtct gattcggttc gtgtatggg agcgtcatgt 4740
tggcgatgt gttgccatga ttctggctc agtggcttgtt aaacgacaag tgtgggtc 4800
ttgtttatTTT atgggcttt tctctggctc ctggcttgc ttctctact atctaccat 4860
ctacttccag gctgtgaagg atgtttctcc cacactgagt ggtgtgtaca tggcctgg 4920
aattcttggaa caagtcatTA tggctatggt ttctggcttc gcaagtaagt gaaactcgCG 4980
tacacatTTT tctccacccc gtccatttct atggctcctt tcttgcacca accgtctgac 5040
atcgggcttg gatatcggtt atactgacat atgacgcacc agttggaaag acaggatact 5100
atTTGCTTG ggcccttaggc agcgctgttc tcgtcgcctt aggccaggt ctggatcca 5160
ccttccagcc ccatacatca actgtgaaat gggtcatgtt ccaatttac ggggcttc 5220
gtcggttgc tggcatgca acggtaagct atgaaacctt tgatcatctc tcacgcttc 5280
ggctttgtat caaagcaaga agagcatgca accgctagac gctgacatca atactcaatg 5340
gccagcctat catcgccatc caaagcacgc ttgcgcctt acaaggtgcc ctggaaattt 5400
ctctcgccgt gttggacag acgtttggag gatcgctt cctggacttt gctaaccTTT 5460
tctttgggtc cggtttgaga actggcctga gcaagtatgc gcccaactgtc gacacgcagg 5520
ccgtgacggc agcagggcgc actggcttca gagatgttgtt cagcaagaat aaccttccag 5580
gggttgtaaa agcttacagt ctcggcttgc atcatactt ttacttagca gtgggagct 5640

cggcgtgcac gtttgtgtt gccttgaa tggatggcg gaagattgca accaaaaacg 5700
acaccgggc tgcgtcgtactgatgtt gaccgcgtt ctagatagac acattaccgt 5760
gcctccacaa agaatctcca catacttaat taatgtcgat ttcaaagatt ctatatgtca 5820
ttgcccgcga cccatgtcta gtctaaagtcc atctcaaggt tctagtcacc gtggctagat 5880
tggcaacata taactatgtt gagattcata gttagtttagt tacggcatct gacaatggat 5940
gattgatgtt tcaggcatca atcctgatac ctcaggaatg aatcagatca acattcaacc 6000
tactcagtaa gttatagctt gaacaaagct ttcactcatt aaataattat gagggatcag 6060
acctaaaacac tctctggaaa aggaccatct ctttatatat tcttctccc tactacttgc 6120
atcgtaaatt tcaacaacat ataaacatga gataccctt ctggccgttc actctaccac 6180
ctgcctgtct cattgcattt tgctttgaa aattatgaca ataacaacca atgagaaaaa 6240
atatgatcct cctgcaatga atccactgga ggggtacgg agcttggat gctcctaaga 6300
ttccgaccta atcagcgtcg agcccgatca gtagctgcag cactcggcct cagtgcattt 6360
tttagaacag ggactgtcct ggttccgcct gacggggaga cacttcgaga aggggctgaa 6420
gatgccgggg cagaacgggt gtgcgccatg tgcgccttga ccaggtgacc ggcggctagg 6480
gcagcacata gcgagagctc cccagccaaa acagcgcttc cgatgtgcg cgcaagtga 6540
cgtgcattct caccgggagt ggtcggtgt gatccgcggc caccaagcat gtcaagcatt 6600
gcccctggg gctccagaat cgtaccaccc cccaacgttc caacctcaat agacggcatg 6660
gagacagaga tttgaagcga tccgcgaaga ctaaacagga ttagtgaatg tttccaagta 6720
agcggccgct ttcaacttac ttgttcatga gagtgtatgc gttagcgctc tccacaactt 6780
gcccggate ctgacctgtg gcaatggaaa tggctgccc aagattggca gcttggcgt 6840
tgaagccgcc aactgagcca gccatagcgg acccaatcag attttcgtat attttgcgt 6900
gaaccatgct atccacatcg ctcttaaga catccctgac aacgttcgcc ggtatgtatgg 6960
cttcggccac aatgcccttgc ccccgccat cgatccaatt caaagctgaa ggtttcttat 7020
ccgtacagta atttcctgtat agggtaataa tattcatatc gctgaaacct gcctctgtcg 7080
ccataacatt cagtgcattgc tccacggcct tagaaatcat attcattccc atagcgctc 7140
cagtagtagt cttaaatcga atatataagt gagtaccggc gatagttgc cgcatactt 7200
gtaagcgcgc aaatctgtcg gttgaattga aggcttctt cattacggc tggccgacgt 7260
ccgaatcgag ccagatcttgcagcaccag ctcgttcaag gacatcaaac ttcacacacg 7320
ggcctcggtcataccgtcg ccagtcagga ctgtcacggc accgccaccg aggttgattt 7380

ccttactgcc acggctagca ctagcgacga ggacgccctc ggtggttgcc ataggaatga 7440
aataactttt gccgtcgata acaataggac cggcgacgccc aacagggact ggcataatgc 7500
caataacgtt ctgcacaacat gcaccgagca cgcgttcccc ggcgttagtt tcgtacggca 7560
gttcgagtg ctccagcata cttgtaaagt ctgcggtagc cggtgtccctc gaaatgatag 7620
agcggcgaac cttgacggca cgagtgcagt ctttgagact cttctctagg gcataaccgg 7680
gaacctttcc ccgcaaagac aaggcaacga catcctcatc gttcaactcg ctgattgtgt 7740
tctgcttcag caaattgtcc agttcgattt gtgtgcgaga cacgggaagt tcactagtgg 7800
ctgtcttc ttctgctcg ttagtgcacct ttagagatgc ttaattaag actaatgagg 7860
catcaactgtc actgtcggtg gtggtaggag tgaacactct ggtctgagga gcttggagac 7920
ttgattgaat ctgaggggtc tggttctggg cagcggtgaa gctttcgcc tggtaagct 7980
caactggatc aactgggtga ctcggagat taggatctt gattcccagt ctggccgcct 8040
tgaacagata gctgttcaga gcgacactta gggcaagtgc cacaaacacc cattggaga 8100
ggacgggatc ttccaggctg gtgagcaggc taccgaccat tttccacca actccatact 8160
cgttagctg cgaggtacca cggtaatgg aaggatactc tagttcgta ttgatgggg 8220
cgaggacagt gaccatagtc gattgaccgc gccctttgc ctggaaaagt agttcatcta 8280
gtccacttcc agtacacctt aagggtctaa gcgggggttt aatggccat ccgctcagac 8340
tttcggtcca agatgatata ctggacaacg atccactaga agaggcttg aaaagggtgg 8400
agccgatgtt gacgagggtt acgataagga aaccaacgac catccagaat ttgaacttcg 8460
gaacactgct gccttcata tcattgccaa acagatatgt acgtgcactg tcttggcat 8520
cattgcttgt cgcgacactc tccgcgtcc gctgactgag accctcatct tccaaacgcgt 8580
accgcatgtt gatatgacgt ttgaggcggt ttacctcgag cttgatagac agaatgcag 8640
tgtagaatgt aaacagcagc agacagtcaa agaacaggat caatgcagct agaacacaga 8700
agtgtgttag cccacaccttgg atgcctaaga cagcaccgat aactaggagc aggatctcg 8760
ccacgtatgt gcacacgata ttgttaaccct tctccgaat ggcgttcgt acggcgtaat 8820
tgatggtaact ttcatgcaatg gctgtcacgc taccctggtc agactgtatc ttctgggct 8880
ttcggtgctg cacagcatag gacaaaacag ccctggtcag agtgtatgc ttctcaaagc 8940
caacgatcac caccaagaag gggaggcctt cggatagcaa cctcatgctc atcgaaaccc 9000
ctagtcttat ggccacgtcg agaccgagga gaaaggcaaa tggacgacaaa 9060
ttgttagccag ccaaaccttc gatcccaatt ttcatgct gaggaagagt gagacgaaag 9120

tcaagtgcata gatataaa cctagcacca tgacaaccac gtcgagcggt tgagcgctct 9180
tgataagatc aagagactct gtccaggat cgtgcaccca ttgagcaagg ctgcgtttg 9240
tgtgagccct ggcagccttc atgatccaca tctggcggtt catctcgatc aattgcgtct 9300
cctgcaattt caggtcgcca ctgttgggg ggatttctt aacagcagcc acgagttccg 9360
gcgcgcgtgct gtattccaca gagaaggcga aaactttatc tttcgaatag gcggtaaag 9420
ggctcgacgt tgagggaaagg tcaatcacag ataggttac agggagggga gcaaggaatg 9480
gtgaggctgc ttgagatgca accccatatg accccgggaa taccaaggc attagtgtt 9540
gatggttgaa atctccgaga acatctgcat ccccgtcgaa gctctgccac ttccagccat 9600
tctgtgggcc ggtgatcaag ctgcacttc ctgcaccaa agagccccat tctgctttat 9660
caacgtttgc gggccatgg aagaagctgt cttagttagt tccaacgtat gtggtaatgg 9720
ctagaatagc tatggtgcaa acggtatggc tcgggtgttag acacgcccgtt ttggatagaa 9780
attggagtgt ggaggtcaat gcccatttc ccgagcgtag agggtgctgc tgattcattt 9840
atccctacc gcgaaagcga gagggtagca acgaagcgac catgctgaaa ggtctgtgct 9900
acagcttggc gtggtaatggc tagcttaggtt gtctctgaga aaagaatcta gtcagctctg 9960
caaatggggc cgaaaagca ctcaattgg gaatttagggc ttgagataaa gtgcataacct 10020
ccaaaatcga atgagcaacc taatcggtt ggcgcctagg tataatctgc cgctgtat 10080
tggaggaagg ttgtcgcc caaggggtt ggagggacaa ctgaacagtt cctaggtacg 10140
ggaaatgagt agaagaaaaat aacaaatggc gcgcgcctt gaggctgagg cagcggaaag 10200
atcgcttcc ttatccctgc atctggtcca ctttatgaa tggattcatg accggtgtca 10260
actgctgcct agggataat tggtaagggg taccacaaaggatgttagt gaccaattgc 10320
actgaaaaact agtatttgc ctcataacta tgctcagttt ccaagggttt tatgcataaa 10380
tttacccctt attcgagaaaa aaagaattct gggacacca atcaattgcc ctgataacct 10440
ggaatgtgaa cttccaagat tggccggaaa gtaggccccaa tgaccaataa gacagaacac 10500
taccttaggtt tagttatgtt gtcatgccta gatccgacat acaaaggagc gtcctttac 10560
atagacgtcc tggtagacgt ttctaatctg actcgatgtt tggcccttt ttgggtgggc 10620
ggcaagctgc atcgatcactg cccggacgag gccacttcgt gaggaatggaaatataattgt 10680
gcctacggag taatgcacca cggaaacacat tcttctcgaa acgactactt acgcaggat 10740
gtatgggtat tattctgtcc acgaaaagcc agtgcataacc ccccccccccc ccccccccccc 10800
cggtatcatt tatctcagta aacagcaacc tgaacaagat acccaggttag acaagaagtc 10860

agtttggagt atagtgtata gactcggaa cattttgtgt ggacctccgt acgtgtctct 10920
caaatcgccg tctctcggtc tttggataacc ttccggagttt cacggggcctt tgttgccaagg 10980
gcttcaatat tcggcgcatg gatTTTCTTT gtgcattgggt ctgagtgcccc tgccgttaagg 11040
tatggtattt ctcccatttggagttctga cagatgatca tgccgccttc cgaagtagaa 11100
aaaagaggaa agggtcacat gctcatgatg atcgTTTGTCTCGCAGTGAAT TGCGCTTCCT 11160
gcataatattt tgTTTGTCTTG TCTTAGTCAA CCGATAATGC AAATTTGGG GATTGTGTAT 11220
tgttggaaat tgaattacca actgcttaca ggaccaccc tgcgctcagg ccctcaacaa 11280
accttggac aggattaccc actaaggcTTT TCCAAGCTT TCCAAGGCTT TTGGATTCTG 11340
ttggTTTGTAT agctcgatg cgtatttcgc atctgtgtac ggagtatcgg attctgacag 11400
cctccattat acccgaaaac tacctggccg gcctgacctg ttctgtctt ttcgacggTTT 11460
tcccattcggc gTTTGTACTC gggattatcg tgacgacaga caatgcctcc cgaaccggta 11520
cctctaaggat attgccccga gcatagcatg gtggTCCGGG GTTCCCAGT GGCACAGAGC 11580
gaatatcgTG tcacgtccaa gatgaaaaca aacccgaac tatgaatcac gtgtcccc 11640
cagcttatgc atctatacgTt atGCCAGGGA CCTGTAGACT GTTGGAAAGAC TATCAACGGT 11700
tttatcacca gggcgactga tatatcagtc aatgaaaaca cgttggaatg aacaataaccc 11760
ccggccgtAAC CGCAACCGCA ACCGCAACCG CAACCGCAAC CGCAATGGCA GGCTCGGCTT 11820
gctctaacac atccacgccc attGCCATAG TTGGAAATGG ATGTCGATT GCTGGAGATG 11880
caacgagtcc acagaagctt tggaaatgg ttgaaagagg aggcagtgcC TGGTCTAAGG 11940
tccccctcgc gcgattcaat gtgagaggag tataccaccc gaatggcgaa agggtcgggt 12000
ccgtgagttt ctaacatgca tgcattata tcttggTTT aatatttgc acaagatttgc 12060
agcatcaactg aagcttggTTT actgactcca aggatgactg gatagacccca cgtaaagggt 12120
ggacacttca tcgacgagga tcctgtttt tttgacgccc cgttcttcaa catgaccaca 12180
gaggtcgcca gcgtatgatt attcaatttgc atctaaccgg ggacgcagag atctaatttgc 12240
ggacagtgcA TGGATCCGCA GTATCGGCTT ATGCTTGAGG TGGTCTACGA ATCGCTGGAG 12300
agtggatgt agtgtgggtc atccctactg taagcaaacg tcactgacca tcattccagcc 12360
ggatcacca tcgatggat ggcaggctt aatacgtcgg tggatgggg tgcgtac 12420
cacgactatc aggattcgct caatcgatgac cccgagacag ttcccggtt aatcataact 12480
ggcaactcag gaacaatgct ttcaaccgg atatcacact tctacgactt acgtggccc 12540
agcgtgacgg ttgacacggc ctgttcgacg acattgaccg cactgcactt ggcgtgccag 12600

agcttacgta ctggggagtc agatacagcc atcggtatcg gtgcaaattct tctgctcaat 12660
cccgtgttt ttgttacgat gtc当地acctg gggtgagttt tccgaagaag attccagatc 12720
gagagtcttg aactaagcaa tccttggtc tcaatgacag atttttgc ccggatggta 12780
tctcgactc ttttgcaccc cgagcgaatg gatatggtc cggggaaaggaa attgcgcctc 12840
tggttaataaaa ggccctccct aacgcgttgc gagaccaaga ccctatccga gccgtcattc 12900
gagagacagc gctgaaccag gatggcaaaa cacccgcaat tactgcgccg agtgatgtgg 12960
cgcagaaaaag tctgatccag gagtgttacg ataaggctgg gctagatatg tcgttgcacct 13020
cgtacgtgga ggcccacggaa actggAACAC caactggta ccccccttggaa atctcagcaa 13080
ttcagcagc ttttaaagga catcctctgc accttggctc tgtgaaagca aatattggcc 13140
atacagaagc cgccagtggtc ctggccagta taatcaaggt ggccttggcc ttggagaagg 13200
gctgattcc ccctaattgcg cggttccctgc aaaagaacag caagctgatg cttgaccaaaa 13260
agaacatcaa ggtaaggctt tgccatcg cagattcgt tatatgttca aaaggtaat 13320
gttcaaaaga tccccatgtc tgctcaagac tggcctgtga aagatgggac tcgtcgcc 13380
tctgtcaata acttcggctt tggtggttcg aatgctcacg tcattttggaa atcatatgat 13440
cgccatcat tggccctgccc agaggatcaa gtgcgttca atggtaactc tgagcatgg 13500
agggttggg atgggtccaa acagagccgc atatacggt tgcgtgcca ggacgagcaa 13560
gcttgcggc gaacgatagc aagcctgcga gactacatta aatccgtcgc tgacattgac 13620
ggggaaaccctt cctcgccag cctcgccat acactaggct ctcggccgttc cattctgcca 13680
tggacgtcag tgtatgttagc agacagcctt ggcggcctt tttctgcctt cagcgatgg 13740
tccaatcaac caaaacgagc gaatgagaaa gtacggctcg gatttgtt caccggtc 13800
ggggcgcagt ggcgttcaat gggcagagag ctggtaata cattcccagt attcaaacag 13860
gcgattctt aatgtgtatgg ctacatcaag caactggcgc cgagttggaa ttttatgggt 13920
aagttgcgag cccggaaaa gtaatactgt atcaagctt aggtactaac attcaattgc 13980
acagaggagc tccaccgtga tgagctgacg actcggtttaa atgatgccga atacagtcta 14040
ccactgtcaa ccgctatcca aattgcactt gtgcgttcc tttggcatg gggaaattcgg 14100
ccaaacggggta taaccagtca ctcaagtggaa gaggctgtc ctgcctacgc agctgggct 14160
ttatccgcgc ggtcgccat tgggatcaact tatatacggt gtgtattgac cactaagccc 14220
aagccccat tggcagccaa aggaggaatg atggcggtgg gtcttgggtc cagtgagacc 14280
aatgtttaca ttgcgttca accaggag gacggctgtg tggtggttgg atgtatcaac 14340

agtcaatgt a gtgtgacgg gtcggagat ttgggtgcaa tcgagaaaact tgaaaagttt 14400
ttacacgccc atggcatctt taccaggaaa ctgaaagtca ctgaaggcctt ccattcaagc 14460
cacatgcgac caatggcaga tgccttggg gcgtcactga gagatctgtt caactcggt 14520
aacaacaacg acaatcccaa tgctgacacc tcaaagggtg tattatattc atcacctaag 14580
actggtagtc gcatgaccga tcttaaattt ctattggatc ccacacactg gatggatagt 14640
atgctacagc cggtagagtt cgagtccctca ctccgcgaga tgtgcttga tcccaacacc 14700
aaagagaaaag ccgtcgatgt gattattgaa atagggcctc acggagcgct tggtggtcca 14760
atcaaccaag tcatgcagga tctgggtctg aaaggaacag atataaacta tctcagttgc 14820
ctttctcgcg gcagaagctc gttggagaca atgtatcgtg ctgctacggg gttgataagc 14880
aagggttatg ggctaaaaat ggacgctata aactttcctc atggaagaaaa agagcccaga 14940
gtgaaggtac tgagcgattt gccggcgatcc cctgttggaaatc accaaacccg ttattggaga 15000
gagcctcgcg gcagtcgtga gtccaaacag agaaccatc cgcctcacac ttgtataggc 15060
tcacggaaat ctctctctcc tcatttcgccc taaaatggaa aacatgttct ccgtctgtca 15120
gatattccat ggatacgaga tcacgtcgatggatc tcatcttcc gggagctggc 15180
ttcatcagca tggccatcga ggggtttca caagtctgcc caccaggatgc gggggcttagc 15240
atcaactaca acttgcgtga cgttgaactc gcgcaggctc tcataatacc cgctgatgca 15300
gaagcagagg ttgacctgcg cctaacgatc cgttcatgtg aggaaaggc cctcggcaca 15360
aagaactggc atcaatttc tgtgcactca atttcggcg aaaataatac ctggacagaa 15420
cactgcaccc gattaatacg ttggagagc gaaagaagcc accttgcactt ttcactgtg 15480
gaagcctcac gcaggatggaa tctaggctca gataaccggg gcattgatcc caacgatctc 15540
ttggagtcct tacacgcgaa tggatatgc cacggaccca ttttcagaa cattcagcga 15600
attcaaaaaca atggacaggg ctcgtttgc agattttcca ttgctgacac tgcctcggt 15660
atgcctcact cgtacgagaa tcgacacatc gtccatccta ctactctggc ctcgggtatc 15720
caggcggcat acacgggtt accctacgcg ggaacacgta tgaaaacggc catggatcca 15780
aggaggctaa gaaatgtcaa aatatccctt agctggctg acttggaggc tggtgatgct 15840
ctggacgcac aggccagcat caaggatcgc aactctcaat cttctctac cgacttggca 15900
gtgtttgatg actatgatag cggttcttccctggacg gaatcccagt catagagatt 15960
gaaggccctt gttccagtc gttggaaagc agcttctctg accaaaagtc agactccaaac 16020
gacacagaaaa atgcctgcag ctccctgggtt tggccctgt acatcagctt gggtgactcc 16080

acttggctca aagaaaagtt gagcactgag gctgagacga aagaaacgga actcatgtg 16140
gacctccgaa gatgcacgat caacttata caggaggctg tcactgattt gacaaattct 16200
gatatccaac atctggatgg ccacccctcag aagtattcg attggatgaa tgcatttcattt 16260
gaccttgcga gacaaaacaa gctcagccccca gccagttgcg actggctaag tgacgtgct 16320
gagcagaaga aatgcctaca ggccagagtc gctggagaaaa gcgtcaatgg cgagatgatt 16380
tctcgtagt gacccatgtt aatagcaatg ctacgcccgcg aaacagagcc acttgagttg 16440
atgatgcaag atcagctgct aagcagatac tacgtcaacg caatcaaattt gaggccatca 16500
aacgcacaag ccagcgagct gatccgactt tgcccccaca agaaccgcg ttctcgattt 16560
ttggagattt gcgaggcac gggggctgc acaaagctta ttgtcaatgc attggaaac 16620
accaagccga tcgatcgatccat tgacttcacc gatgtgtctg ccgggtttt cgagtccgcg 16680
cgtgagcaat ttgcggattt gcaagacgtg atgactttca aaaaatttggaa tattgaaagc 16740
gatcccggc aacaagggtt tgaatgtgcc acctacgatg tggcgtggc ttgcaggc 16800
ctgcatgcaa ctcgatgcat gaaacgaaca ctgagtaacg ttgcggattt gctcaaggct 16860
ggggcaact tgattttgtt tgagactacc agggatcagc tcgattttttt cttaaccttc 16920
ggactgttgc caggttggtg gctcagtgag gaggctgagc ggaagtcgac gccatcgctc 16980
actaccgatc ttggaaacac catgttggac acgagcggtt tcaacgggtt ggaatttggag 17040
tttcgtgatt gtgaagacga tgagtttac atgatcagca caatgctatc gacggctaga 17100
aaagagaata caaccccgga tacagtggca gaatcgagg tgctttgtt gcacggagcg 17160
ctccgacccctt cttcatctt gctggaaagt ctccaggcag caattttgttga aaagaçcagt 17220
tctagcccat cgatcaacgc tctggcgcag gtagatacca ctggaaaggac atgcattttt 17280
cttggggaaa tggagtcctc gctccttggaa gaggtggaa gcgagacctt caaatccatc 17340
accgcgtgc tgaataactg caacgcactt ctctgggtgt cttagaggagc agccatgagc 17400
tccgaggatc catggaaagc tctacatatt ggtctgtgc gtaccatccg caacgaaaat 17460
aacggaaagg aatatgtatc gttggatctc gatcctctc gaaacgcata cacccacgag 17520
tccctgtatc ctatctgcaa tatcttcaat ggccgcctcg ggcaccccttc cgaagacaag 17580
gagttgaat ttgcagagag aaacggcgctc atccacgtac cgccactttt caatgacccg 17640
cactggaaagg accaagaagc ggttgggttc acactgcagc cgttcgagca accccggcg 17700
cgtctgcgga tggaggttga gacgccaggctt ccctgcaatt tcgagacgac 17760
gaaggacgtg aaggcaagga tcttccggat gattgggttag aaatcgaacc caaagctt 17820

ggctcaatt ttcggatgt catggtgcc atgggtcaat tggaggccaa ccgtgtatg 17880
ggcttcgaat gcgcggagt gatcacaaag ctgggtggag ctgtgtccgc tagccaaggc 17940
ctcagattag gggaccgcgt atgtcacta ctgaaaggcc attggcgac cagaacacag 18000
acgccgtaca ctaatgtcgt ccgtattccg gacgaaatgg gcttcccaga agccgcttcg 18060
gtccccctgg ctttcaactac cgcatatatt gcgcattata ccacggccaa gctacgacga 18120
ggcgaaagag tcgttatcca cagtgagct ggaggcgctg gtcaaggcagc gatcattttg 18180
tcccagcttgcggat caatccggat ctttgcgtc acagcggaa ctcaagccaa gcgtgacttt 18240
gtcggcgata aattcggcat caatccggat ctttgcgtc acagcggaa ctcaagccaa gcgtgacttt 18300
gtcggcgata aattcggcat caatccggat ctttgcgtc acagcggaa ctcaagccaa gcgtgacttt 18360
gcaggtcaac tcctccaagc aagctttgac tgcatggccg aattcggcagc atttggtag 18420
attggaaaaaa aggaccttggaa gcaaaacagc agacttgaca tgctgccatt cacccggac 18480
gtctttca catcaatttgatcttgcgt tggcaaagag ccaaaagtga agaagtatcc 18540
gaagcgttga accatgtcac aaaactcctc gagacaaaag cgattggctt gattggccaa 18600
atccagcagc actccttgcgt aacatcgag aaggccttcc gtacgatgca gagtggcag 18660
catgttggca aagttgttgtt caatgtatct gggacgaaac tggtccagt cggcgatgg 18720
gggttctgc tgaagctgaa gcctgacagt ttttaccttgcgt tggctgggtt gctgggggaa 18780
attggaaaaagc agatctgtca gtggcttgcgtt gatcatggcg cgaagcactt gattatcc 18840
tcgagaagtgc caaaggccag tccattcata accagcttgc aaaatcaaca gtgcgttgc 18900
tatctacacg catgtgacat ctcagatcaa gatcaggteca ccaaggtgtt ccgggttgc 18960
gaagaagcac atgcaccgc aattcgaggt atcatacaag gtgcgttgc tctcaaggac 19020
gcttttat cgcgaatgac attggatgaa ttatgcag caacacgccc aaaagtacag 19080
ggtagtttgtt atttcacaa gatcgacag gatgttgcgt ttttgcgtat gctctcatcc 19140
cttgggggg tcatgggtgg ggcaggccag gccaattacg cagctgtgg tgcattccag 19200
gacgcacttgc cgcaccacccg gagagcccat ggcattgcgg ctgtcaccat tgacttggc 19260
atggtaagt ctgttggata cgtggctgaa actggccgtg gtgtggccga ccggctcgct 19320
agaataggtt acaaggcttgcatgaaag gacgtcatgg atgtgttggaa gaaggcaatc 19380
ctgtttttt cccctcaatt tccatcacct cccgcagctg tggttacagg aatcaacaca 19440
tccccgggttgc ctcactggac cgaggccaaac tggatacagg aacagcggtt tgtggactt 19500
aaataccgc aagtccatca tgcagaccaa tccttgcgtt cttgcataaa aaaaggacca 19560

gatggcgtgc gggcccaact aagcagggtc acctctcacg acgaggccat ttctatcgic 19620
ctcaaagcaa tgacggaaaa gctgatgcga atgtttggtc tggcagaaga cgacatgtcc 19680
tcgtccaaaa acctggcagg tgtcggcgta gactcactcg tcgccattga acttcgaaac 19740
tggatcacat ctgaaatcca tggatgtg tcgatcttg agctcatgaa tggtaaacacc 19800
atcggccggcc tcgtcgagtt agttgtggcg aaatgcagtt aagttgaagg gttcagtgaa 19860
gcctttgtc tggccaagcg ggtatagctc gacggaggta tagtacgaag gagcatagcg 19920
gccatggtct gaaggctgaa tccaatctga atcgaggctg ggctgagcct gactattaa 19980
tgcctgactt ctggatagca gtaaatagag atacctgaaa taccattaca gtggccctga 20040
gaagcaacaa agtacacatg tgcactcggtt ctcgaagtgc gaagagtgaa tgcttttat 20100
actaccagg aagctgtctt agcacctcggtt aggcttgcgt gtcaaaagtt ctcttttt 20160
ctctccatta tgattcccgca aagccttgcataatgcgtt gaacggcgtga aaggcgttgg 20220
cacggcagt gggtacagat tgtggatatg tagtcggaag gcgggaggaa gtacttgtt 20280
ccacgtcggtt gcgcgcgtctt ctcttcgccc tagtcgggaa tggtagtagt gaacatcaag 20340
acttaacaga gcctaagcccc tcgtcatcgta aagcgccagt caacgcctga gagaatgggg 20400
agatcggtga ttgtaccggg agaaaagctt cattactgcc gacttcccta cgtggcgttg 20460
tagctggcgg tatagaagca gatggccgtt ctgcgttagca ggaatacaca ctctccct 20520
tctctcttc tggatgttctg tctctcgac atagccaaag tctacaccac gttcgattac 20580
aaagaaggca tcacaatcgaa ataaaatgcgttttattta ctaacctact cgactaatac 20640
agcacctagt ttctctggca cggaaactat tggataaagc ctggggacgg atgcataattt 20700
gttttagttt gcgtgttata tcttagcacc ggtcatgagg gagcgggatg tcctcggttc 20760
gccggcgtac catgagctt gtgggtggat gcatacgaac gctaaaagcg tgacggtagt 20820
atttgtcatc gtctcctgggtt acaggctca catcatactg aatcagtata tgagcgagga 20880
gaatcttgat ttccctcgag gcgaagaacc gcccggtaca agcgcgtggg ttccagccga 20940
agccgatgtg atcaccgttg gtattctcca attgagcggtt gaaggccttgc tctggatcct 21000
cgcgcatcgcataaatcggtt tagggatcat aatttcggg gtttccac acatcagggt 21060
tgttcatcggtt gtctcgagcc acagcggcca actcgccctt gggaaatgaag aggccattgg 21120
atagagtgtat gtctctgaga gcggtaactgc gcatagtggc gcactcgacc ggcttgcatttc 21180
gctgcgtctt ttcatcgatcgtt cttgcgtt gcttcagttt gaacagagag gcaggcgtcc 21240
agcccccttc tccgattaca gtgcggatct cttggcggag aggctgaata aggtctgggt 21300

gcctggcaat gtccacaagg gcaccgacga aaagatccgt cgaggcgtag atgccggcga 21360
aatccatagc gagctgagca cccgccacat cgtaccagcg gccgtcgccg gtgtttcaa 21420
accattgcac ggtatcgacg tactggggcg gctgcacgccc ttcgctaca catgcggcct 21480
ttcagcacg tcgtcgctga atctcaggat caatgatctt tcgtgcgcgg cgcaacttgtt 21540
cacgcaattt gcgtccttgc ggttcaaacc agtgagcggc cggtcgcaat agcatggcc 21600
atacgcgaag ttggcgagct tgtaccgcca cactcacggc atggttctt gcaatatcca 21660
gccactcctc attgtggcag atttgtcgc cgaccataat gagtgtgact gttcggtga 21720
caaggtccaa tccattggaa tagacaggtg cgggttgcactcttagtata ttgcggtat 21780
gtcagccaga ggctcaatgc tcaagacaga aaaattgaca cttaccctcg ctttaccga 21840
acaacttggc aatagtagcg tcggccaagg tagccaatgg ctttgttac ttggggcctt 21900
gggtttgttaa ctggttcaaaa acaactttgt tgacaagatg tgcatcctgg cagatttctt 21960
tgaacccgtc gaatccaggg agatgagagt gaaagtccata tacattcatc agaatcttag 22020
agacgtcatt gagttacaac aatggaaaat tcagaggtca tacatccgccc aaaaacttgt 22080
acatgcacat atcttgatt ttccgaaact cgtcgccat ggacgatggg aggatggtgc 22140
aatagccgga atcaacaatg aagcgcaggg gcttgcgtt tttcgagaac caagttcga 22200
tccagctcgg accatacgtt tcgaagtcct gcctagccct catggtcgtc aactcccacc 22260
atttttggg attataact tgcagttcgg actggcgccc ccgcaaacgg taggcgtatga 22320
gactaagaag cactgcgacc gccacaaggg cttgaggggt cgatacccat tggtagtgc 22380
cgacggtcag aagaacctgg ccgagcattt cgtgagacag ataggaccta tgcacaccag 22440
tggaaaagaa gaaagagcga agaatgagag cgctgcgacg gtttataatc gaataacagc 22500
actaatgctt ctgggatttt gtggccgaga gcactttcc agtcaacctt gaaaaaaaaa 22560
aaaccccccc cccaatcgaa gtttacctgg atggggcagt tcgggttgc ctttaggag 22620
cagttcacc gagcagcaca agaacaatcc gagtggaaaaa ctcggttca cttgataca 22680
gccaaattgat attcacgtt gattcattca gcctcggtt accgaataac gccgtatgga 22740
ggaatggcta ttctgtcacc gaatgacgccc gggagggtt gctaggtgcc gagcttgcatt 22800
tgctggaaag tggggcatt tgagttacttag aatggatctt gaaattgtcc gaatcttagat 22860
gagttactgat acgtgcaagt aaatataacg acggatcggtt tgcaaggcc ggcttgcatt 22920
ctcagagatt caactctgcg attctgttaag aacaaatgtt gtgccggca tgcagtgaga 22980
agatctactg acgcaagaca aggttaatc ccaatcttat cgcccaaaaaa caggatcgc 23040

agttatggat caagccaaact atccaaacga gccaaattgtg gtagtggaa gcgggttgtcg 23100
gtttccaggt ggtgtcaaca caccatcaa actttgggag ctgctcaaag agccccggga 23160
tgtacagacc aagatcccta aggagagatt tgacgtcgat acatttaca gccccgatgg 23220
cactcacccc gggcgacga acgcacccct tgcatacttg ctgcaggagg atctacgcgg 23280
ttttgatgcc tccttcttca acatccaagc tggagaggcc gaaacgattg acccacagca 23340
aaggctgctg ctggagacgg tctatgaagc tgtatccaac gcaggcctac ggatccaagg 23400
ccttc当地 gtc当地tactg ctgtgtacgt cggtatgatg acgcatgact atgagactat 23460
ctgtacgcgt gaattggata gtattcctac atactctgcc acggggtag ctgtcagtgt 23520
ggc当地ccaac cgtgtatcat acttcttcga ctggcatggg cc当地gtgtga gtgccactca 23580
ttgagcgagc cc当地actcgt caagtgtga cagattcctg actgattctg cagatgacga 23640
tc当地cacagc ctgttagttca tccttagctg cc当地gtcatct ggccgtccaa cagcttagaa 23700
cggc当地gagag taccatggcg gttgc当地ccg gt当地gaatct gatattggc cccatgacct 23760
ttgtaatgga gagcaaattg aacatgctgt ccccaatgg tagatctcga atgtggatg 23820
ctgctgccc当地 tggatatgcc agaggagtaa gttgacaatg catcaattcc tttcaaaaaaa 23880
agcaagatgg cactgaccc local ctgtaactgc ttttaggaa ggtgtttgct ctattgtcct 23940
gaaaacgctg agccaggcac tgc当地gacgg ggacagtatc gagtgtgtta tccgagagac 24000
cggtatcaac caagatggcc gaacgacagg tatcacaatg ccaaaccata ggc当地acaaga 24060
agccctcatt cgggccc当地 atgccaaggc tggctttgat attaccaacc cccaggaacg 24120
ctgccc当地ttc tttgaagccc atggtaagtg gtattccctg gaagtatcag ccttatggaa 24180
gttgc当地gaaa gtctctctt cc当地aacacg aagatccag gaactggtag accagccggt 24240
gacccacagg aagctgaggc tattgcaaca gc当地tcttcg gacacaagga tggaaacaatc 24300
gacagcgacg gcgagaaaaga tgagctttt gtc当地cagca tcaagacagt tctcggtcac 24360
acggaaggca ctgctggat tgc当地ggctta atgaaggcat cgttgctgt acgaaatggc 24420
gtgatccc当地 caaacctgct gtttggaaag atcagtc当地cc ggatcgctcc gttctatacg 24480
cacttggaaa ttgcaacggc ggccacagaa tggccgattt tt当地gccc当地 ggccctc当地 24540
agagtcaacg ttaattcatt tggtaaggat tcaactgc当地 ttcttggaa cggaaatgaa 24600
gttagctaaa catataaaca catcaggatt tgggtgtaca aatgccc当地 ctattatcga 24660
agagtatatg gtc当地ctccac acaagccgac agcagtgta acagaggta cctcagatgc 24720
agatgc当地atgc agcttggccc tt当地gtcttc atc当地gaatgc cagc当地ctcc当地 tggaggcaac 24780

gctagaaaaat atgc tccaat ttctggaaac gcatgatgac gtggacatgc atgatatcgc 24840
atatacccta cttgagaaaac ggtctatctt gcccttcgt cgtcgattg cagcacacaa 24900
caaggaagta gcccgcgcgg cactggaggc tgccatcgcg gacggtgagg tcgtcaccga 24960
cttccgcacc gacgcaatg acaaccctcg cgtacttaggt gtctttactg gccaagggtgc 25020
acagtggccg ggcattgctga agaagctcat ggtgggtatg ccatttgta gaggcattct 25080
cgaagagctg gataattcac tgcaaacact gcctgaaaag tatcggccta cgtggacact 25140
gtatgaccag ctcatgcttgc aaggggatgc ctcaaacgtc agactcgcca gcttctccca 25200
gcctctatgc tgcggcgtac aaatcggttct ggtccgactt ctcgctgcag ctggatcg 25260
gttcagtgca attgtcgcc acagttcagg tgagattgcc tgtgcctttg cggcaggatt 25320
catcagtgcc actcaagcta tccgtattgc gcatctgcgt ggagttgtgt ccgcggagca 25380
tgccctttctt ccaagcggcc agacaggcgc tatgctagcg gcaggtatgt cgtacgatga 25440
cgcaaaggaa ctatgcgagc tcgaagcctt tgagggtcgg gtctgcgtcg ccgctagcaa 25500
ttcacccggat agtgtgaccc tctccggcga catggatgct atccagcagc ttgaaggtgt 25560
cttggaggat gaatccactt ttgccagaat cttgagagtt gacaaggcctt accattcgca 25620
tcacatgcac ccatgcgcag ctccatatgt caaggcatttgc ctggagtgcg actgtgtgt 25680
tgccgatggc caaggtAACG atagtgttgc ttggttctt gccgtccacg agaccagcaa 25740
gcaaattgact gtacaggatg tgatccccgc ttattggaaa gacaatctcg tctctccgg 25800
cttggttctcg caggctgtgc agaaaggcagt catcactcat cgtctaattcg acgtcgccat 25860
cgaaattggc gcccacccctg ctctcaaggg tccgtgtcta gccaccatca aggatgtct 25920
tgccgggtgtg gagctgccgt ataccgggtg cttggcacga aacgttgacg atgtggacgc 25980
ttttgttggaa ggtctgggat acatttggaa gcgtttcgga gttcgagta tcgacgcccga 26040
gggcttcgtta caacaagtcc ggcccgatcg tgccgttcaa aacctgtcaa agtcatgtcc 26100
cacatactct tgggatcata ctcgtcaata ctgggcagaa tctcgctcca cccgcccagca 26160
tcttcgttggaa ggtgcgcggcc atcttctgct tggaaagctt tcttcttaca gcacagcatc 26220
gaccttccag tggacaaact tcatcaggcc ccggatctg gaatggctcg acggatcg 26280
gctacaaggc cagactgtgt tccccgtgc tgggtacata attatggcca tggaaagctgc 26340
catgaaggtg gctgggtgagc gtgccgccta agttcagctc ctggaaatct tggacatgag 26400
catcaacaaa gccatcggtt ttaaagatga aaacaccctcc gtggagctga acttgacagc 26460
cgaagtcacc agtgcataatg atgcggatgg ccaagtcacg gtcaaatttgc ttattgattc 26520

gtcttcagta cacatgctgt ggatgccacc gttgagcggt tttatgtatcc actttctgt 28320
ccatttgaagg actcatacccc gccatttagtg gttatcggtg gcgaatcgac aaaaaccgaa 28380
cgcattttga acgacatgaa agctgcccta ccgcataagac acatccactc cgtcaagcgg 28440
ctggaaagtg ttctcgacga cccggcctt cagcctaagt cgactttgt catcctctcg 28500
gaacttgatg atgaagtgtt ttgcaacctt gaagaggaca agtttggagc agtcaagtct 28560
cttcttttcatgcggacg catgatgtgg ctgacagaga atgcctggat tgatcatccc 28620
caccaggcca gcaccatcgg aatgttgggg acaatcaagc tcgagaaccc tgacttggga 28680
acgcacgtct tcgatgtcga tactgtggag aacctagaca ccaaattctt cggtgagcaa 28740
cttttgcgttcgaggagatcgatgtcag cttttggaat caataacatg gactcatgag 28800
cccgaaagtgt actggtgcaa gggtcgtgcc tgggtccctc gtttgaagca ggttattgt 28860
aggaacgacc gtatgaactc gtctcgctgt ccaatttgcgtaactttaa ttctgtccaaag 28920
acggccatttgcactgaaaga ggcgagggga gcatccatcgatgtacta ttctgtacta 28980
accgagacgt gtgattcggtt agaagacgct cgatgtcgt gaaaagcaac ttctgtgtt 29040
cgctacgctt ttccccaggc aatttcgcgtg ggcacatctcg gatacttcca ttctgtgcag 29100
ggcagttttc tggagaatac atgtgggtt cctgtgtcg ccctggctga gaagaatgg 29160
tctatactgc atgtaccgag aaactacatg catgtctgc ccgataacat ggcggaaaggc 29220
gaggatagtt cttttttgtt gtccacagct gcagccctcc ttggcggaaac aattctctct 29280
agcgctcagt cttttggctc tgatgcata attctgatta tggagcccc aatctctgc 29340
gtcaaaagcaa ttctggagtc ggcacaaacc tacgggttc agtttattt ggcaacaact 29400
ctgtccgacg tcaaaactat tccggctccct tggatccgt tacatgccaa gggaaaccgac 29460
gctcggctga aacacagcc ggcacaaac atgtggcat tctttactt gtctaccgac 29520
cgactgctg ccggataac caaccgtttt gccaagttgc taccacccag ttctgtcatg 29580
tacagtgggtt actatcttccgaagtaca gttccacat acaaagtttgcatgtttag 29640
gatattccaa tcctcgagca ctctgtggca atggcaaaaa ataccgtctc tgcgtcgact 29700
gtcgacgaca ctgagaaagt tattacagcc acacaaatttcttgcctgg tcaactctct 29760
gtcaaccaca atgaccaacg cttaatctg ggcacccgtca tcgactggaa gggaaatgg 29820
gtgtccgcta ggatttgccttccatcgactctt ggtacttattttccaaaca gaagacgtat 29880
ttgtttgttgcgttccatcgactctt ggtacttattttccaaaca gaagacgtat 29940
ggcgcccgcc atgttgcgttccatcgactctt ggtacttattttccaaaca gaagacgtat 30000

aacatggagg cacttgggtgg tgacatcacc gttctgtcaa tgtaagttga ttgatatacac 30060
atcacacacctt gctaccacat cctcgttac ttatccaatt actttctta gggatgtgc 30120
caatgaggat tcaagtgcgtg ctggccttgg caagcttgc gatatgaagt tgccacctgt 30180
tgccggcatc gcgttcgggc ctttggtgct gcaggatgtc atgctgaaga acatggacca 30240
ccagatgtg gacatggtgt tgaagccaa ggtacaagga gcacgcattc ttcatgaacg 30300
gttctccgaa cagacggca gcaaggcgct cgacttctc atcatgttt cgtccattgt 30360
tgcagttatt ggcaatcctg gccagtc当地 ctatggcgct gcgaatgc当地 acctacaggc 30420
tctggcccag caacgggtgc当地 ccagaggatt ggc当地 tctaccctg aattatcatg 30480
catcgacgtc aagttactaa cgcacaacca cagggatcaa ccatcgatata tggtgc当地 30540
tacggtag ggttgc当地 gagggccgag atggaggagg actttgatgc tatccgtt当地 30600
atgttgact cagttgaaga gcatgagctg cacacgctt tc当地 gaaggc当地 ggtcggtct 30660
gaccagcgtg cccggcagca accacagcgc aagacggtca ttgacatggc ggacctt当地 30720
cttaccacgg gtatccc当地 tcttgc当地 ctgc当地 aattat ttactt当地 30780
gaccctcggtt tc当地 gaaactt caaaattccc ggtcaacgc当地 gagacggtgg cgacaatgg 30840
tcagggtcta aaggctccat tgccgaccag ct当地 aacaag caacaactt agaccaagtt 30900
cgccaaatcg tgattggtaa gttatctctc atgc当地 ttcc local tgatatcgag tt当地 aaactaa 30960
caaagttgca gatggcttat ctgagaaaact cc当地 gt当地 tacc当地 agggta 31020
gagcgtggac ccaaccattc ct当地 cattga tcaagggtgc gactc当地 ttgg gt当地 cagtgac 31080
tgtc当地 gctca tggttctcaa agcaactcta cttgacccctc cc当地 ct当地 gggtacttgg 31140
cggtgcttct gtc当地 gatc ttgccgacga cggccacc cc当地 ct当地 acatccat 31200
tccgctgctg ttgcaaattt gttatccac gggaaactcg gacagc当地 ggg ctttccgac 31260
accaacagac agccatgatg aagcaagctc tgctaccagc acagatgc当地 cgtc当地 gacca 31320
agaggatgaa gagcaagagg acgataatga gcaggaggc cgtaagattc ttgc当地 cgc当地 31380
gaggttgc当地 ctggccagg agtattc当地 tggc当地 gagcaaa caaatggtaa aagatcatac 31440
catcttcaac aacactattt gcatgttcat gaagggtacc attgacctcg accggtt当地 31500
gc当地 ggctctg aaaggctcat tgccgc当地 tca cggatctc cgtacgtgc ttgttactgg 31560
cgatgactat agcagcgatt taaatggtcc cgtccaaatg gttctcaaga acccgagaa 31620
cagagtgc当地 tttgttccagg tgaacaacgc tgccgaggc gaggaagagt accggaaact 31680
cgagaagaca aactatagca tctccacagg tgacactctc agactcggtt atttctactg 31740

gggcacagat gaccacctgt tggtaatcggtt acccacaga ttagttgggtt atggctcaac 31800
aacagaaaaac ctgttcaatg agatcgggca gatttacagc ggggtgaaaa tgcagcgacc 31860
atcgacccaa ttctctgate tagccgtcca acagcggaa aacctggaaa atggcgaat 31920
gggggacgat atcgcgttct ggaagtccat gcatagcaa gtctcgat ctgcgccaac 31980
cgtgcttccc atcatgaatc tgatcaatga ccctgctgcc aattcagagc agcagcaa at 32040
acagccattc acgtggcagc agtatgaagc aattgcttgt ttagatccca tggtcgcctt 32100
ccgaatcaa gagcggagcc gcaaggacaa ggcaaccccc atgcagttt acctggccgc 32160
ctaccacgtt ttgttggcgc gtcttaccgg cagcaaagac ataaccatcg gcctcgccga 32220
aaccacccga tccaccatgg aagaaatttc ggcgatggc ttttcgcta acgtgcttcc 32280
cctgcgctt gatgagttcg tcggcagcaa gacattcggc gagcacctt tagccaccaa 32340
ggacagtgtg cgtgaggcca tgcaacacgc ggggtgccc tatggcgtca tcctcgactg 32400
tctaggcctg aatctcccta ctcaggcga ggaacccaag actcagacac acgcacccctt 32460
gttccaggct gtcttgatt acaaggcagg tcaagcggag agtggctcaa ttggcaatgc 32520
caaaatgacg agtgttctcg cttccgtga ggcactcct tatgacatcg ttctcgagat 32580
gtgggatgac cttaccaagg acccactcat tcatgtcaaa cttcagagct cgctgtatgg 32640
ccctgagcac gtcaggcct ttgttagacca ctttcttca atcctacta tggctcgat 32700
gaacccggct ctgaagttgg cctagatcg tcaagcggcgt gaattcagat gtgtggttt 32760
agtgttggc atgataaaga tggattagaa attggcaata gagcagatgg caaatctatc 32820
ctgaattcgg cgtcaattga cacacgcata ttcatctaca aatagcgaat tcgtttgtt 32880
tctttgtcaa aattacttct accttcgttgc tcttttttta ttgcagcaat cgtaacatca 32940
agttagatag cgccgttcag agtaccgtaa cggtgataaa tatacctcgg tagcgcgtt 33000
cgaaagactc tgtgaggaag gtgaaacctc caaggctgg aattgatttc aatccatcct 33060
gtatataaat tcgacgccat tgcaaatagt tccatagtta ctggtttagt gccttgggt 33120
ggtgatcgag tggttttaga tgtctgtcat gcctgttcag aacgagcctt ccatgatcta 33180
tccaaaatat gttcacgaaa tatttatgag atggtcgcga ccactataac taaatcaccc 33240
ttggaagggtg agcattcaaa ccgtgttgcgaa ttgcgttgcgaa tcaaattttgt tcagtaaaaa 33300
tgtggatgg actaggcatg agagccagag cttgtata taccctgttgc ttcaccc 33360
acaaatgaac ctgacatctt gaccttttgc tatacgatgtt ggaagcgtt gaccgtctcc 33420
tggacatcac tcgggtctgtt gggaaaatta tgcttccct gaaactcgag tacatctgca 33480

ttctgaggca ggtaatgtgt ttcaaccatc tgtctcgacc cttggagagc aaaatcttga 33540
cgaccgtgaa gatgcagtgt cggtcacgttg attattagct tgcgtcgac gtcttgcgc 33600
tcggctctca tgtaatctct ggcttcatcg ctatagaaac agcaaataa aacagcaatg 33660
ctcatttcg gaaaccatgg cagtttccc atttgctgtt gatggaggcag caaagtggcg 33720
accaatgcgc cctcagagaa ggccactatg ccgacaatgg gtgcctgtgg gtttagttata 33780
gaccaatctt ggacggtctt ttgcacaggc ccgatcacag ccgctactct atgcgccacc 33840
gtgggggttg tcgtgtttgt aacggcgtca tgcgtttt ggaaccagggt gtagtatgga 33900
ccccatgcctt ggaagacagg aagcacgccc ggtccgggc tggagctaaa cggcgccgc 33960
gcatatacga attcaaactc gttttcaac gccacgcgc gtttagagat ctggacgcgg 34020
aatatggctg ctgagcaccc ggcaccgtgg atgcataaga gagctttct cggtttgcct 34080
ggcgagaaat ctgtaatctt cgctggactc attttctt gttgggtgag ctgtgacttc 34140
gtctgttctg gggaaatttgt tagtcattac tgacaaggaa ataacaacga cgttagtattg 34200
atc 34203

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer
which has a DNA sequence deduced from the amino
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (9)

<223> i

<400> 3

gayacngcnt gyasttc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer
which has a DNA sequence deduced from the amino
acid sequence of PKS of Aspergillus flavus.

<220>

<221> modified base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (8)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (15)

<223> i

<400> 4

tcnccnknrc wgtgncc

17

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 5

gcatgttcaa tttgctctc

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 6

ctggatcaga cttttctgc

19

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 7

gtcgcagtag catgggcc

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 8

gtcagagtga tgcttttc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 9

gttgagagga ttgtgagggc

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 10

ttgcttgtgt tggattgtc

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 11

catggtaactc tcgccccgttc

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 12

ctccccagta cgtaagctc

19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 13

ccataatgag tgtgactgtt c

21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> **Penicillium citrinum**

<400> 14

gaacatctgc atcccgta

19

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> **Penicillium citrinum**

<400> 15

ggaaggcaaa gaaagtgtac

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> **Penicillium citrinum**

<400> 16

agattcattg ctgttggcat c

21

<210> 17

<211> 722

<212> DNA

<213> **Penicillium citrinum**

<400> 17

ggccacgcgt cgactagttac gggggggggg gggggggggg gcttggcgc tcagagattc 60

aactctgcga ttctgtttaa tcccaatcct atcgcccaaa aacaggatca gcagttatgg 120

atcaagccaa ctatccaaac gagccaattg tggttagtggg aagcggttgt cggtttccag 180
gtgggtgtcaa cacaccatca aaactttggg agctgctcaa agagccccgg gatgtacaga 240
ccaagatccc taaggagaga tttgacgtcg atacattta cagccccgat ggcactcacc 300
ccggcgcac gaacgcaccc tttgcatact tgctgcagga ggatctacgc ggtttgatg 360
cctctttctt caacatccaa gctggagagg ccgaaaacgat tgacccacag caaaggctgc 420
tgctggagac ggtctatgaa gctgtatcca acgcaggcct acggatccaa ggccttcaag 480
gatcctctac tgctgtgtac gtcggtatga tgacgcatga ctatgagact atcgtgacgc 540
gtgaatttggaa tagtattcct acatactctg ccacgggggt agctgtcagt gtggcctcca 600
accgtgtatc atacttcttc gactggcatg ggccgagtt gacgatcgac acagcctgta 660
gttcatcctt agctgccgtg catctggccg tccaacagct tagaacgggc gagagtacca 720
tg 722

<210> 18

<211> 760

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 18

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg gggggggggg gactatcaac ggttttatca 60
ccagggcgcac tgatatatca gtcaatgaaa caacgttggaa atgaacaata ccccccgt 120
aaccgcaacc gcaaccgcaa ccgcaaccgc aaccgcaatg gcaggctcgg cttgctctaa 180
cacatccacg cccattgcca tagttggaat gggatgtcga ttgtgtggag atgcaacgag 240
tccacagaag ctttggaaa tggttgaaag aggaggcagt gcctggtcta aggtcccctc 300
ctcgcgattc aatgtgagag gagtataccca cccgaatggc gaaagggtcg ggtccaccca 360
cgtaaagggt ggacacttca tcgacgagga tcctgctta ttgacgccc cgttcttcaa 420
catgaccaca gaggtcgcca gctgcatgga tccgcagtt cggcttatgc ttgaggtgg 480
ctacgaatcg ctggagagtgc cggttatcac catcgatggatggcaggct ctaatacg 540
ggtgtttggg ggtgtcatgt accacgacta tcaggattcg ctcaatcg 600
agttccgcgt tatttcataa ctggcaactc aggaacaatg cttdcgaaacc ggatatcaca 660

cttctacgac ttacgtggtc ccagcgtgac gggttgcacacg gcctgttcga cgacattgac 720
cgcaactgcac ttggcggtgcc agagcttacg tactggggag 760

<210> 19

<211> 773

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 19

ggccacgcgt cgacttagtac gggggggggg ggttttttt ttttcaaggt tgactggaag 60
agtgcgtctcg gccacaaaat cccagaagca ttagtgcgtt tattcgatta taaaccgtcg 120
cagcgctctc attcttcgct ctttcttctt ttccactggt gtgcataagg ctatctgtc 180
tcacgcaatg ctggccagg ttcttctgac cgtgaatcg taccaatggg tatcgacccc 240
tcaagccctt gtggcggtcg cagtgcgttct tagtctcatc gcctaccgtt tgcggggcgc 300
ccagtcgaa ctgcaagtct ataatcccaa aaaatggtgg gagttgacga ccatgagggc 360
taggcaggac ttgcatacgt atggtccgag ctggatcgaa gcttggttct cgaaaaacga 420
caagccccctg cgcttcattt tgattccgg ctattgcacc atcctcccat cgtccatggc 480
cgacgagttt cggaaaatca aagatatgtg catgtacaag ttttggcgg atgactttca 540
ctctcatctc cctggattcg acgggttcaa ggaaatctgc caggatgcac atcttgtcaa 600
caaagttgtt ttgaaccagt tacaaccca agccccaaag tacacaaagc cattggctac 660
cttggccgac gctactattg ccaagttgtt cggtaaaagc gaggagtgcc aaaccgcacc 720
tgtctattcc aatggattgg accttgcac acgaacagtc acactcatta tgg 773

<210> 20

<211> 527

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 20

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg gtaccttagga actgttcagt tgtccctccc 60
aaccccttgg gccgaacaac cttcctccaa tctacgacgg cagattatac ctaggcgcct 120
aaccgattag gttgctcatt cgattttgga gagactacct agctataagg accactccaa 180
gctgttagcac agacctttca gcatggtcgc ttcgttgcta ccctctcgct ttgcggtag 240
ggaatcaatg aatcagcagc accctctacg ctggaaaat cggcattga cctccacact 300
ccaatttcta tccaaaacgg cgtgtctaca cccgatccat accgttgca ccatagctat 360
tctagctagt accacatacg ttggactact caaagacagc ttcttccatg gccccgaaaa 420
cgttgataaaa gcagaatggg gctcttggt cgaaggaagt cgaagcttga tcaccggccc 480
acagaatggc tggaagtggc agagcttga cggggatgca gatgttc 527

<210> 21

<211> 522

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 21

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg gggggggggg ggatccatca atctgacttc 60
aggctagcgg accttaacga aacaacgaga gcgagatcat tcatacacca aaacacaggt 120
actatagaag cgccgcgcag tagagattca caccgcctt tgaagcaaaa gtcggaaagga 180
attgcgcgat gtcagaacct ctaccccta aagaaggga accaaggcca cagaaggaag 240
aaagtcaaaa tgacacgctc gaagcgactg agtccaagtc ccagcacatc acaggcctca 300
agctcggct ggtggttgct tcagttactt tcgttagcatt tttgatgctc cttgatatgt 360
ccattatcgt cacggcaatc ccacatatca caagcgagtt ccactctcg aacgatgtag 420
ggtgttacgg cagtgcttat cttctggcta actgtgctct ccagccctg gccggtaaat 480
tgtatacact cttggcttg aagtacactt tctttgcctt cc 522

<210> 22

<211> 541

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 22

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg ggctcacctc acattatttgc atcttaatcc 60
aataattatg tccctgccgc atgcaacgtatccgacgaac ctacgcccgtc gcgcgtttcg 120
acgctcatgt gaccgggtgtc atgcacaaaaa gctcaaattgt accggtagca atgccaattt 180
agtccgtgct cagtgtaaac gttgtcagca agccggatta aggtgtgtgt acagcgaaag 240
gctacccaag cgcaatttac ataaagaagc cgcaagcttggactacaagag ccacagaaac 300
ctcacaacccg atgaccgcga catcttctac ggtcttctca tcattggcag agactcctcc 360
accttactgc tcaccaccta cgcatattgg cacctcggca ctcaaggaaa cattatcaga 420
accatcagcg gcaaccctgc aattctatga tacatcaatc aactttgatg atcccgagtc 480
gtttccccggc ggctggcctc agccaaatac atttcgac gatgccaaca gcaatgaatc 540
t

541

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 23

atcataccat cttcaacaac

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 24

gctagaatag gttacaagcc

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 25

acattgccag gcacccagac

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 26

caacgccccaa gctgc当地atc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 27

gtctttcctt actatctacc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 28

ctttcccagc tgctactatac

20

<210> 29

<211> 1524

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 29

aactggaaga attcgccggcc gcaggaattt tttttttt ttttttcaa cgaaggtaga 60
agtaattttg acaaagatac aagacgaatt cgctatttgt agatgaatat gcgtgtgtca 120
attgaagccg aattcaggat agatttgcca tctgctctat tgccaaatttc taatccatct 180
ttatcatgaa caacactcaa accacacatc tgaattcacg ggcgtgaacg atctaggcca 240
acttcagagc cgggttcatc gagaacatag tgaggattga agaaaagtgg tctacaaagg 300
cctgagcgtg ctcagggcca tacagcgagc tctgaagttt gacatgaatg agtgggtcct 360
tggtagggtc atcccacatc tcgagaacga tgtcataagg agtgcgtca cggaaagcga 420
gaacactcgt catttggca ttgccaattt agccactctc cgcttgaccc tgctttaat 480
caaagacagc ctggaacaag gggcggtgtg tctgagtctt ggttcctcg cctgaggttag 540
ggagattcag gcctagacag tcgaggatga cgccatacgg caccggcgcg tggcatgg 600
cctcacgcac actgtcctt gttggctacaa ggtgctcgcc gaatgtctt ctgccgacga 660
actcatcaaa ggcgaggggaa agcacgttag cgaaaaagcc catgcccgaatttccca 720
tggtagatcg gttggttcg ggcaggccga tggtatgtc tttgtgtccg gtaagacgcg 780
ccaacaaaac gtggtaggcg gccaggtaga actgcatggg ggttgcctt tgctgccc 840
tccgctctt gattcgaaag ggcaccatgg gatctaaacg agcaattgtc tcataactgt 900
gccacgtgaa tggctgtatt tgctgtgtc ctgaattggc agcagggtca ttgatcatgt 960
tcatgatggg aagcacggtt ggcgcagatg acgagacttt gctatgcgt gacttccaga 1020
acgcgatatc gtccccatt cgcccathtt ccaggtttc ccgctgttgg acggctagat 1080
cagagaattt ggtcgatggt cgctgcattt tcaccccgct gtaaatctgc ccgatctcat 1140

tgaacagggtt ttctgttggtt gagccatcac caactaatct gtggtagccg attaccaaca 1200
ggtgttcatac tgtgc(cc)ag tagaaatcaa cgagtctgag agtgtcacct gtggagatgc 1260
tatagttgt cttctcgagt ttccggtaact ctccctctgc ctccgcagcg ttgttcacct 1320
gaacaaaagtg cactctgttc tccgggttct tgagaaccac ttggacggga ccatttaaat 1380
cgctgctata gtcatacgcca gtaacaaagc acgtacggaa gatctcgta cggcgcaatg 1440
aggcttcag agcccgccctc aaccggtcga ggtcaatggt acccttcatg aacatgccaa 1500
tagtgggtt gaagatggta tgat 1524

<210> 30

<211> 784

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 30

aactggaga attcgccggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttc tttgttgctt 60
ctcaggggcca ctgtaatggt atttcaggta tctctattta ctgctatcca gaagtcaggc 120
attaaatagt caggctcagc ccaggctcga ttcagattgg attcaggctt cagaccatgg 180
ccgctatgct ctttcgtact atacccgtt cgagctatac ccgcttggcc agacaaaagg 240
cttcaactgaa cccttcaact taactgcatt tcgccacaac taactcgacg aggccggcga 300
tgggttacc attcatgagc tcaaagatcg acacatcaac atggatttca gatgtgatcc 360
agttcgaag ttcaatggcg acgagtgagt ctacgcccac acctggcagg tttttggacg 420
aggacatgtc gtcttctgcc agaccaaaca ttgcacatcg ctttccgtc attgcttga 480
ggacgataga aatggccctcg tcgtgagagg tgaccctgct tagttggcc cgacacccat 540
ctggcccttt tttatgcgaa gagacaaaagg attggctgc atgaaggact tggcggatt 600
taagtccccac aaaccgctgt tcctgtatcc agtttgcctc ggtccagtga gcacccgggg 660
atgtgttcat tcctgttaacc acagctgcgg gaggtgatgg aaattgaggg gaagaacaca 720
ggattgcctt ctccaaacaca tccatgacgt cttttcatg cataggcttgc taacccattc 780
tagc 784

<210> 31

<211> 764

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 31

aactggaaga attcgccggc gcaggaattt tttttttttt ttttttttc gaataaaaatg 60
cgtttttattt tactaaccta ctcgactaat acagcaccta gtttctctgg gacggaaacc 120
attggaataa gcctggggac ggatgcataat ttgttttagt ttgcgtgtta tatcttagca 180
ccggtcatga gggagcggga tgtcctcggt ggcgcggcgt accatgagct ttgtgggtgg 240
atgcatacga acgctaaaag cgtgacggta gtatttgtca tcgtctcctg gtacaggctt 300
cacatcatac tgaatcagta tatgagcggag gagaatctt atttccttcg aggccaagaa 360
ccgccccggga caagcgcgtg ggttccagcc gaagccgatg tgatcacccgt tggattctc 420
caattgagcgt gtgaaggcct tgtctggatc ctcgcccgtc cgccataaattc ggttagggatc 480
ataatttcg gggttttccc acacatcagg gttgttcatg cggctctgcag ccacagcggc 540
caactcgccc ttgggaatga agaggccatt ggatagagtg atgtctctga gagcggtaact 600
gcgcatacgatg ggcactcga ccggcttgat tcgcgtgcgtc tcttcatgc agctgtcgag 660
gagcttcagc ttgaacagag aggcaggcgt ccagccccct tctccgatta cagtgcggat 720
ctcttggcgg agaggctgaa taaggtctgg gtgcctggca atgt 764

<210> 32

<211> 765

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 32

aactggaaga attcgccggc gcaggaattt tttttttttt tttttctgg aaaaggacca 60
tctctttata tattttttttt ccctactact tgcacatgtaa atttcaacaa catataaaca 120
tgagataaccc tttctggccg ttcactctac cacctgcctg tctcattgca ttgtgtttt 180

gaaaattatg acaataacaa ccaatgagaa aaaatatgat ctcctgcaa tgaatccact 240
ggaggggta cgagcttgg aatgctccta agattccgac ctaatcagcg tcgagcccga 300
tcagtagctg cagcactcgg ctcagtgc a ttgttaggaa caggactgt cttggttccg 360
cctgacgggg agacacttcg agaaggggct gaagatgccg gggcagaacg gttgtgcgcc 420
atgtgcgcct tgaccaggtg accggcggct agggcagcac atagcgagag ctccccagcc 480
aaaacagcgc ttccgatgtat gcgcgcaagt tgacgtgc at ttcaccggg agtggtcggg 540
tgtgatccgc ggacaccaag catgtcaagc attgcgcctt ggggctccag aatcgatcca 600
ccgccccaaacg ttccaacctc aatagacggc atggagacag agatttgaag cgatccgcga 660
agattgttca tgagagtgtat gcagtttagcg ctctccacaa cttgcgcggg atcctgaccc 720
gtggcaatga aaatggctgc cgcaagattt gcagcttggg cgttg 765

<210> 33

<211> 802

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 33

aactggaaga attcgccggcc gcaggaattt tttttttttt tttttataga atctttgaaa 60
tcgacattaa ttaagtatgt ggagattctt tgtggaggca cggtaatgtg tctatctagc 120
aacgcggta agcatcagtc tcaggcacag cccgggtgtc gttttgggtt gcaatcttcc 180
cccatccat tccaaaggca aacacaaacg tgcacgcgt agctccact gctaagtaaa 240
aagtatgatc aacggcgaga ctgtaagctt ttacaacccc tggaaaggta ttcttgctga 300
ccacatctct gaagccagtc gcccctgctg ccgtcacggc ctgcgtgtcg acagtggcg 360
catacttgct caggccagtt ctcaaaccgg acccaaagac aaggtagca aagtccagga 420
agagcgatcc tccaaacgtc tgtccaaaca cggcgagaga aattccgagg gcacctgttt 480
cggcgaaag cgtgctttgg atggcgatga taggcgtttg catgccacaa ccacgaccga 540
agcccgcat aaattggtagt atgacccatt tcacagttga tgtatggggc tggaaaggtagg 600
ataccagacc tgcgcctatg ggcacgagaa cagcgtgccc tagggcccaa ggcaaatagt 660
atcctgtctt tccaaattgctg aagccagaaa ccatagccat aatgacttgc 720

caggcaacat gtacacacca ctcagtgtgg gagaaacatc cttcacagcc tggaaagtaga 780
tcggtagata gtaggaaaag ac 802

<210> 34

<211> 562

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 34

aactggaaga attcgccggcc gcaggaattt tttttttt ttttttttac taagcaatat 60
tgtgtttctt cgctaattgcg aatatttcct tatagcaacg tcgcaacaca tttatcgtct 120
tccctgaggc ctttggac ttggctctt cgtctccggc ttcgtcactc caaaggcacag 180
ataggagacg agaggccggc gttatggttt tatttcagc gccaggatt tgccacgatg 240
tgcttggcat atctgatagg actagacgaa tagatgccgc agccccgtgc tcctgtgcta 300
tccccaaagc agtctcaatc ccactcaata gtcgaaggct tacacgcaat gtcgtgcatg 360
cagaagataa ggcgtgcatg aatgggtcga gatgtgaaat gagctcgccg atatgaagat 420
tagagtgaaa cgagggaaagt gcttcggctc ttccattgtc atttcttagt gttgagccag 480
accagtacca atccattcgt gtgcattgc tttgtccaca aggttggct ttcattcacct 540
cggatagtag cagctggaa ag 562

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1' C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1' C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)
GenBank/DDJB/EMBL/Geneseq, PIR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Kennedy J. et al., "Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis", Science (May 1999) Vol.284, pp.1368-1372 | 1-60 |
| Y | Hendrickson L. et al., "Lovastatin biosynthesis in Aspergillus terreus : characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthesis gene", Chem. Biol. (June 1999) Vol. 6, No. 7, pp.429-439 | 1-60 |
| Y | WO, 95-12661, A (Merck & CO INC), 11 May, 1991 (11.05.91), & AU, 9480955, A & EP, 726940, A1 & JP, 9-504436, A & US, 5744350, A & US, 5849541, A | 1-60 |
| Y | Serizawa N., "Development of two-step Fermentation-based Production of Pravastatin, a HMG-CoA Reductase", J. Synth. Organ. chem. (1997) Vol. 55, No.4, pp.334-338 | 1-60 |
| Y | FUJII, I, "Polyketide Kousei Busshitsu Seigousei Idenshi no Cloning", Research report of Mochida Kinen | 1-60 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 November, 2000 (20.11.00)Date of mailing of the international search report
05 December, 2000 (05.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)
GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq, PIR

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | Kennedy, J. et al. "Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis" Science (1999, May) 第284巻 p. 1368-1372 | 1-60 |
| Y | Hendrickson, L. et al. "Lovastatin biosynthesis in <i>Aspergillus terreus</i> : characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthesis gene" Chem. Biol. (1999, Jun.) 第6巻 第7号 p. 429-439 | 1-60 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に記載を掲げる文献又は他の文獻の施行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

引地 進

4 N 9549



電話番号 03-3581-1101 内線 3488